

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. Dezember 2003 (04.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/100072 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12P 11/00

(74) Anwalt: REITSTÖTTER, KINZEBACH & PART-
NER; Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/05423

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. Mai 2003 (23.05.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(30) Angaben zur Priorität:
102 22 858.2 23. Mai 2002 (23.05.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): SCHRÖDER, Hartwig [DE/DE]; Benzstr. 4, 69226 Nussloch (DE). KRÖGER, Burkhard [DE/DE]; Im Waldhof 1, 67117 Limburgerhof (DE). ZELDER, Oskar [DE/DE]; Franz-Stützel-Str. 8, 67346 Speyer (DE). KLOPPROGGE, Corinna [DE/DE]; Diemersteinstrasse 3, 67065 Ludwigshafen (DE). HÄFNER, Stefan [DE/DE]; Luitpoldstr. 11, 67063 Ludwigshafen (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF SULPHUR-CONTAINING FINE CHEMICALS BY FERMENTATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR FERMENTATIVEN HERSTELLUNG SCHWEFELHALTIGER FEINCHEMIKALIEN

(57) Abstract: The invention relates to methods for the production of sulphur-containing fine chemicals by fermentation, in partic-
ular L-methionine, using bacteria in which a nucleotide sequence is expressed which codes for an S-adenosylmethionine synthase
(metK) gene.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur fermentativen Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien,
insbesondere LMethionin, unter Verwendung von Bakterien, in denen eine für ein S-Adenosylmethionin Synthase (metK)-Gen ko-
dierende Nukleotidsequenz exprimiert wird.

WO 03/100072 A2

BEST AVAILABLE COPY

VERFAHREN ZUR FERMENTATIVEN HERSTELLUNG SCHWEFELHALTIGER
Beschreibung FEINCHEMIKALIEN

Gegenstand der Erfindung ist neues Verfahren zur fermentativen Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin und L-Cystein, bei dem
5 Bakterien genutzt werden, in denen Nukleotidsequenzen exprimiert werden, die für Mutanten der S-Adenosylmethionin-Synthase (metK) (E.C.2.5.1.6) kodieren; Nukleotidsequenzen, welche für diese Mutanten kodieren, sowie die damit transformierten rekombinanten Mikroorganismen, sowie neuartige metK-Mutanten mit veränderter Enzymaktivität.

10 Stand der Technik

Schwefelhaltige Feinchemikalien, wie zum Beispiel Methionin, Homocystein, S-Adenosyl-Methionin, Glutathion, Cystein, Biotin, Thiamin, Liponsäure werden über natürliche Stoffwechselprozesse in Zellen hergestellt und werden in vielen Industriezweigen verwendet,
15 einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie. Diese Substanzen, die zusammen als "schwefelhaltige Feinchemikalien" bezeichnet werden, umfassen organische Säuren, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Vitamine und Cofaktoren. Ihre Produktion erfolgt am zweckmäßigsten im Großmaßstab mittels Anzucht von Bakterien, die entwickelt wurden, um große Mengen der
20 jeweils gewünschten Substanz zu produzieren und sezernieren. Für diesen Zweck besonders geeignete Organismen sind die gram-positiven, nicht-pathogenen coryneformen Bakterien.

Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer
25 Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zum
30 Produkt, beispielsweise durch Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Über Stammselektion sind eine Reihe von Mutantenstämmen entwickelt worden, die ein Sortiment wünschenswerter Verbindungen aus der Reihe der schwefelhaltigen
35 Feinchemikalien produzieren. Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen hinsichtlich der Produktion eines bestimmten Moleküls werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Dies ist jedoch ein

zeitaufwendiges und schwieriges Verfahren. Auf diese Weise erhält man z.B. Stämme, die resistent gegen Antimetabolite, wie z. B. die Methionin-Analoga α -Methyl-Methionin, Ethionin, Norleucin, N-Acetylnorleucin, S-Trifluoromethylhomocystein, 2-Amino-5-heptencarbonsäure, Seleno-Methionin, Methioninsulfoximin, Methoxin, 1-Aminocyclopentan-
5 Carbonsäure oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und schwefelhaltige Feinchemikalien, wie z. B. L-Methionin, produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierender Stämme von *Corynebacterium*
10 eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aus der JP-A-06-020809 ist eine Nukleotidsequenz für ein S-Adenosylmethionin kodierendes Gen aus *Brevibacterium flavum* MJ-233, einem coryneformen Bakterium, bekannt. Die
15 korrespondierende Aminosäuresequenz umfasst 412 Aminosäuren. Das Protein weist unter anderem in den Positionen 24 und 94 jeweils einen Cysteinrest auf, welche in den entsprechenden Enzymen zahlreicher anderer coryneformer Bakterien konserviert sind. Die offenbarte Aminosäuresequenz besitzt einen charakteristischen Sequenzabschnitt zwischen den Resten 137 und 154. Die Herstellung von Mutanten und deren Verwendung bei der
20 fermentativen Herstellung schwefelhaltiger Feinchemikalien ist darin nicht beschrieben

Aus der WO-A-01/00843 ist ein *metK*-Gen aus *C. glutamicum* bekannt, welches für ein Protein mit 407 Aminosäuren kodiert und eine Sequenz gemäß SEQ ID NO:16 aufweist.

25 Verbesserungen der fermentativen Herstellung von Feinchemikalien korrelieren in der Regel mit Verbesserungen von Stoffflüssen und Ausbeuten. Wichtig dabei ist es, Zwischen- oder Endprodukthemmungen wichtiger Synthesenzyme zu verhindern oder zu verringern. Ebenso ist es von Vorteil, Abflüsse des Kohlenstoffflusses in ungewünschte Produkte oder Seitenprodukte zu verhindern oder zu verringern.

30 Der Einfluss von Stoffwechselmetaboliten auf die enzymatischen Aktivitäten von Stoffwechselenzymen kann untersucht werden. Beispiele für solche Enzyme können *metA*, *metB*, *metC*, *MetY*, *metH*, *metE*, *metF* und weitere Enzyme im Stoffwechsel von Mikroorganismen sein. Ein wichtiges Stoffwechselprodukt des Methionins und damit ein
35 wesentlicher Abfluß ist S-Adenosylmethionin.

Gleichzeitig ist S-Adenosylmethionin aber auch ein entscheidender Regulator der Methioninbiosynthese. Es ist zum Beispiel bekannt, dass die Biosynthese von L-Methionin in E. coli durch S-Adenosylmethionin inhibiert wird. S-Adenosylmethionin wirkt dort als ein Co-Repressor des Repressors metJ (Weissbach, H. Brot, N. (1991) Mol Microbiol. 5 (7), 1593-1597).

Die Synthese des S-Adenosylmethionins ist gleichzeitig ein wesentlicher Abfluß des gewünschten Wertproduktes L-Methionin. Deshalb ist es aus mehreren Gründen wünschenswert, die Menge des gebildeten S-Adenosylmethionins zu verringern:

- a) die Menge des gebildeten L-Methionins würde erhöht,
- b) die Repression von Genen der Methionin-Biosynthese verringert und
- c) die Feedback-Inhibition von Enzymen der Methionin-Biosynthese würde verringert.

Die Deletion des metK Gens wäre der einfachste Weg, die Bildung des S-Adenosylmethionin zu verhindern. In Wei, Y. und Newman, E.B. (2002) Mol. Microbiol. 43 (6), 1651-1656 wird metK aber als ein essentielles Gen beschrieben und scheint somit für den Fachmann als Ansatzpunkt für eine verbesserte fermentative Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere von L-Methionin auszuscheiden.

20. Kurze Beschreibung der Erfindung

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein neues Verfahren zur verbesserten fermentativen Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, und die dafür erforderlichen Mittel bereitzustellen.

Gelöst wird obige Aufgabe überraschenderweise durch Bereitstellung eines Verfahrens zur fermentativen Herstellung einer schwefelhaltigen Feinchemikalie, umfassend die Expression einer metK Nukleotidsequenz in einem coryneformen Bakterium, wobei die Nukleotidsequenz für eine S-Adenosylmethionin Synthase Mutante kodiert, deren Aktivität gegenüber dem Wildtyp Enzym verändert, vorzugsweise verringert, ist. Beispielsweise ist die Mutante von der S-Adenosylmethionin Synthase aus Corynebacterium glutamicum abgeleitet und zeigt, gemessen in Corynebacterium glutamicum, eine geringere Aktivität als das Wildtypenzym.

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung wenigstens einer schwefelhaltigen Feinchemikalie, welches folgende Schritte umfasst:

- a) Fermentation einer die gewünschte schwefelhaltige Feinchemikalie produzierenden coryneformen Bakterienkultur, wobei in den coryneformen Bakterien zumindest eine Nukleotidsequenz exprimiert wird, welche für ein Protein mit veränderter S-Adenosylmethionin Synthase (metK) -Aktivität kodiert;
- 5 b) Anreicherung der schwefelhaltigen Feinchemikalie im Medium und/oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der schwefelhaltigen Feinchemikalie, welche vorzugsweise L-Methionin umfasst.
- 10 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform besitzt das mutierte coryneforme Bakterium außerdem eine, im Vergleich zum nichtmutierten Wildtyp, verbesserte metY Aktivität und/oder eine gesteigerte L-Methionin Menge (z.B. in g/l Fermentationsbrühe).

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird als metK-kodierende Sequenz insbesondere eine

15 kodierende Nukleotidsequenz verwendet?, welche für ein Protein mit verringerter metK-Aktivität kodiert, in welchem wenigstens ein Cysteinrest des Wildtypproteins substituiert ist.

Vorzugsweise ist die metK-kodierende Sequenz eine kodierende Nukleotidsequenz, die für ein Protein mit metK-Aktivität kodiert, welches folgende Aminosäureteilsequenz gemäß SEQ

20 ID NO:23 aufweist:

G(F/Y)(D/S)X¹X²(S/T)X³(G/A)V

worin

X¹ und X² unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure stehen;

25 und

X³ für eine von Cys verschiedene Aminosäure steht.

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren gemäß obiger Definition, bei welchem die metK-kodierende Sequenz für ein Protein mit metK-Aktivität kodiert, wobei das Protein eine

30 Aminosäuresequenz von Val1 bis Ala407 gemäß SEQ ID NO: 22 oder eine dazu homologe Aminosäuresequenz, welche für ein Protein mit funktionaler Äquivalenz steht, umfasst.

Die erfindungsgemäß eingesetzte metK-kodierende Sequenz umfasst vorzugsweise eine kodierende Sequenz gemäß SEQ ID NO: 21 oder eine dazu homologe Nukleotidsequenz,

35 welche für ein Protein mit metK-Aktivität kodiert.

Die kodierende metK-Sequenz ist vorzugsweise eine in coryneformen Bakterien replizierbare oder eine stabil in das Chromosom integrierte DNA oder eine RNA.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt, indem man

- a) einen mit einem Plasmidvektor transformierten Bakterienstamm einsetzt, der wenigstens eine Kopie der kodierenden metK-Sequenz unter der Kontrolle regulativer Sequenzen trägt, oder
- b) einen Stamm einsetzt, in dem die kodierende metK-Sequenz in das Chromosom des Bakteriums integriert wurde.

Besonders bevorzugt sind Stämme obiger Definition in denen zusätzlich die Aktivität des metK-Wildtyp-Enzyms vollständig oder teilweise entfernt wurde, wie z.B. durch Deletion der kodierenden Sequenz des Wildtypenzyms.

Außerdem kann es wünschenswert sein, Bakterien zu fermentieren, in denen zusätzlich wenigstens ein weiteres Gen des Biosyntheseweges der gewünschten schwefelhaltigen Feinchemikalie verstärkt ist; und / oder in denen wenigstens ein Stoffwechselweg zumindest teilweise ausgeschaltet sind, der die Bildung der gewünschten schwefelhaltigen Feinchemikalie verringert.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden deshalb coryneforme Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines der Gene, ausgewählt unter

- 1) dem für eine Aspartat Kinase kodierenden Gen lysC,
- 2) dem für eine Aspartat-Semialdehyd Dehydrogenase kodierenden Gen asd
- 3) dem für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierenden Gen gap,
- 4) dem für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierenden Gen pgk,
- 5) dem für die Pyruvat Carboxylase kodierenden Gen pyc,
- 6) dem für die Triosephosphat Isomerase kodierenden Gen tpi,
- 7) dem für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierenden Gen metA,
- 8) dem für die Cystathionin-gamma Synthase kodierenden Gen metB,
- 9) dem für die Cystathionin-gamma Lyase kodierenden Gen metC,
- 10) dem für die Methionin Synthase kodierenden Gen metH,
- 11) dem für die Serin Hydroxymethyltransferase kodierenden Gen glyA,
- 12) dem für die O-Acetylhomoserin Sulfhydrylase kodierenden Gen metY,
- 13) dem für die Methylen-Tetrahydrofolat Reduktase kodierenden Gen, metF

- 14) dem für die Phosphoserin Aminotransferase kodieren Gen serC
15) dem für die Phosphoserin Phosphatase kodieren Gen serB,
16) dem für die Serine Acetyl Transferase kodieren Gen cysE,
17) dem für die Cystein Synthase kodierenden Gen cysK,
5 18) dem für die Homoserin Dehydrogenase kodierenden Gen hom,
überexprimiert ist.

Gemäß einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden
coryneforme Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines der Gene
10 ausgewählt unter Genen der oben genannten Gruppe 1) bis 18) so mutiert ist, dass die
korrespondierenden Proteine, verglichen mit nicht mutierten Proteinen, in geringerem Maße
oder nicht durch Stoffwechselmetabolite in ihrer Aktivität beeinflusst werden und dass
insbesondere die erfindungsgemäße Produktion der Feinchemikalie nicht beeinträchtigt wird,
oder so dass ihre spezifische enzymatische Aktivität gesteigert wird:

15

Gemäß einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden
coryneforme Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines der Gene,
ausgewählt unter

- 19) dem für die HomoserineKinase kodierenden Gen thrB,
20 20) dem für die Threonin Dehydratase kodierenden Gen ilvA,
21) dem für die Threonin Synthase kodierenden Gen thrC
22) dem für die Meso-Diaminopimelat D Dehydrogenase kodierenden Gen ddh
23) dem für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase kodierenden Gen pck,
24) dem für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierenden Gen pgi,
25 25) dem für die Pyruvat Oxidase kodierenden Gen poxB,
26) dem für die Dihydrodipicolinat Synthase kodierenden Gen dapA,
27) dem für die Dihydrodipicolinat Reduktase kodierenden Gen dapB; oder
28) dem für die Diaminopicolinat Decarboxylase kodierenden Gen lysA
abschwächt ist, insbesondere durch Verringerung der Expressionsrate des
30 korrespondierenden Gens.

Gemäß einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden
coryneforme Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines der Gene der
obigen Gruppen 19) bis 28) mutiert ist, so dass die enzymatische Aktivität des
35 korrespondierenden Proteins teilweise oder vollständig verringert wird.

Vorzugsweise werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin-haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, welches folgende Schritte umfasst

- a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus, vorzugsweise mit verringerter metK-Aktivität gemäß obiger Definition, in einem Fermentationsmedium;
- b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe;
- c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und
- d) Trocknung der gemäß b) und/oder c) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

Die Erfindung betrifft außerdem isolierte Polynukleotide, die für ein Polypeptid mit verringerter metK-Aktivität gemäß obiger Definition kodieren; sowie metK-Mutanten mit verringerter Aktivität, welche von diesen Polynukleotiden kodiert werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem rekombinante coryneforme Bakterien, die ein mutiertes metK Gen gemäß obige Definition exprimieren und insbesondere solche rekombinante coryneforme Bakterien welche das metK-Wildtypenzym nicht mehr exprimieren.

Bevorzugte rekombinante coryneforme Bakterien zeigen im Vergleich zum korrespondierenden Wildtypstamm wenigstens eines der folgenden Merkmale:

- a) geringeren intrazellulären S-Adenosylmethionin Titer (
- b) geringere intrazelluläre S-Adenosylmethionin Synthase Konzentration, oder
- c) geringere Aktivität der S-Adenosylmethionin Synthase, bestimmt anhand der S-Adenosylmethionin Bildungsrate;

und zusätzlich gegebenenfalls wenigstens eines der folgenden Merkmale:

- d) verbesserte metY Aktivität, oder
- e) gesteigerte L-Methionin-Menge.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

a) Allgemeine Begriffe

- 5 Als Proteine mit der biologischen Aktivität der „S-Adenosylmethionin Synthase“, kurz auch metK genannt (E.C.2.5.1.6), werden solche Proteine bezeichnet, die in der Lage sind L-Methionin und ATP zu S-Adenosyl-Methionin umzusetzen. Dem Fachmann sind weitere Details des metK-Proteins bekannt. Die enzymatische Aktivität von metK kann durch Enzymtests nachgewiesen werden, Vorschriften dafür finden sich in: Markham, G.D. et al.
10 (1983) Methods in Enzymology 94:219-222.

- Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfasst der Begriff „schwefelhaltige Feinchemikalie“ jegliche chemische Verbindung, die wenigstens ein Schwefelatom kovalent gebunden enthält und durch ein erfindungsgemäßes Fermentationsverfahrens zugänglich ist. Nichtlimitierende
15 Beispiele dafür sind Methionin, Homocystein, S-Adenosyl-Methionin, Cystein, und insbesondere Methionin und S-Adenosyl-Methionin.

- Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfassen die Begriffe „L-Methionin“, „Methionin“, „Homocystein“ und „S-Adenosylmethionin“ auch die korrespondierenden Salze, wie z. B.
20 Methionin-Hydrochlorid oder Methionin-Sulfat.

- „Polynukleotide“ bezeichnet im allgemeinen Polyribonukleotide (RNA) und Polydeoxyribonukleotide (DNA), wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.
25

Unter „Polypeptiden“ versteht man erfindungsgemäß Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

- Der Begriff „Stoffwechselmetabolit“ bezeichnet chemische Verbindungen, die im Stoffwechsel von Organismen als Zwischen- oder auch Endprodukte vorkommen und die neben ihrer Eigenschaft als chemische Bausteine auch modulierende Wirkung auf Enzyme und ihre katalytische Aktivität haben können. Dabei ist aus der Literatur bekannt, dass solche Stoffwechselmetabolite sowohl hemmend als auch stimulierend auf die Aktivität von Enzymen wirken können (Biochemistry, Stryer, Lubert, 1995 W. H. Freeman & Company,
30 New York, New York.). In der Literatur ist auch beschrieben, dass es möglich ist durch Maßnahmen, wie Mutation der genomischen DNA durch UV-Strahlung, ionisierender Strahlung oder mutagene Substanzen und nachfolgender Selektion auf bestimmte
35

Phänotypen, in Organismen solche Enzyme zu produzieren, in denen die Beeinflussung durch Stoffwechselmetabolite verändert wurde (Sahm H., Eggeling L., de Graaf A. A. Biological Chemistry 381(9-10):899-910, 2000; Eikmanns BJ., Eggeling L., Sahm H. Antonie van Leeuwenhoek. 64:145-63, 1993-94). Diese veränderten Eigenschaften können auch
5 durch gezielte Maßnahmen erreicht werden. Dabei ist dem Fachmann bekannt, in Genen für Enzyme auch gezielt bestimmte Nukleotide der für das Protein kodierenden DNA so zu verändern, dass das aus der exprimierten DNA-Sequenz resultierende Protein bestimmte neue Eigenschaften aufweist. So kann zum Beispiel erreicht werden, dass die modulierende Wirkung von Stoffwechselmetaboliten gegenüber dem nicht veränderten Protein verändert
10 ist. Enzyme können auch derart in ihrer Aktivität beeinflusst werden, dass es zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit, oder zu einer Veränderung der Affinität gegenüber dem Substrat kommt.

Die Begriffe "exprimieren" bzw. "Verstärkung" oder „Überexpression“ beschreiben im Kontext
15 der Erfindung die Produktion bzw. Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden. Dazu kann man beispielsweise ein Gen in einen Organismus einbringen, ein vorhandenes Gen durch ein anderes Gen ersetzen, die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöhen, einen starken Promotor verwenden oder ein Gen verwenden, das für ein entsprechendes Enzym
20 mit einer hohen Aktivität kodiert und man kann gegebenenfalls diese Maßnahmen kombinieren.

Die Begriffe „abschwächen“ und „verringern“ beschreiben im Kontext der Erfindung die Abschwächung oder Verringerung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme
25 in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden. Dazu kann man beispielsweise ein Gen in einem Organismus deletieren, ein vorhandenes Gen durch ein anderes Gen ersetzen, die Kopienzahl eines Transkriptes des Gens bzw. der Gene erniedrigen, einen schwachen Promotor verwenden oder ein Gen verwenden, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigeren Aktivität kodiert und man kann gegebenenfalls
30 diese Maßnahmen kombinieren.

Die „verringerte Aktivität“ einer erfindungsgemäßen S-Adenosylmethionin Synthase-Mutante oder eines funktionelle Äquivalents kann durch den Vergleich mit der Aktivität der nativen S-Adenosylmethionin Synthase, wie z.B. aus Corynebacterium glutamicum Wildtyp, ATCC
35 13032, bestimmt werden. Geeigneterweise bringt man dazu Plasmide, die in Corynebacterium glutamicum replizieren, und die die Gene für S-Adenosylmethionin Synthase-Mutanten tragen, durch Transformation z.B. in Corynebacterium glutamicum Wildtyp, ATCC

13032 ein. Außerdem bringt man entsprechende Plasmide in *Corynebacterium glutamicum* Wildtyp, ATCC 13032 ein, die das Wildtypenzym S-Adenosylmethionin Synthase exprimieren. Solchermaßen erhaltene *Corynebacterium glutamicum* Transformanten werden in geeigneten Medien kultiviert und in der logarithmischen Phase des Wachstums bei gleicher OD₆₀₀ geerntet. Danach werden aus den geernteten Zellen beider Transformanten nach bekannten Protokollen Proteinextrakte hergestellt. Gleiche Mengen dieser Proteinextrakte (nach Proteinbestimmung) werden dann in einen S-Adenosylmethionin Synthase Assay nach Markham, G.D. et al. (1983) *Methods in Enzymology* 94: 219-222 eingesetzt. Die Radioaktivität des gebildeten S-Adenosylmethionins wird in einem Szintillationszähler bestimmt. Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität des radioaktiven L-Methionins, sowie der eingesetzten Proteinmenge läßt sich die Rate der S-Adenosylmethionin-Bildung aus der Zunahme der eingebauten Radioaktivität pro Zeiteinheit bestimmen. Ihre Einheit lautet $\mu\text{mol S-Adenosylmethionin}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$. Diese Rate kann zwischen Wildtypenzym und Mutantenzym verglichen werden. Nach dem gleichen Prinzip sind ausgehend von anderen Wildtyp-Enzymen mit S-Adenosylmethionin Synthase-Aktivität erfindungsgemäß brauchbare Mutanten herstellbar.

Eine „verringerte Aktivität“ erfindungsgemäß ist insbesondere dann gegeben, wenn die spezifische Aktivität der Mutante auf eine Restaktivität von etwa 1 bis 90 %, vorzugsweise 3 bis 70%, wie z.B. 5 bis 10% der Wildtyp-Aktivität verringert ist .

b) Erfindungsgemäße metK-Proteine

Die erfindungsgemäßen Polynukleotidsequenzen kodieren für Proteine mit veränderter, insbesondere verringerter S-Adenosylmethionin Synthase Aktivität gemäß obiger Definition.

Vorzugsweise sind die erfindungsgemäß brauchbaren Mutanten durch Substitution eines oder mehrerer konservierter Cysteinreste innerhalb der metK-Aminosäuresequenz grampositiver und/oder gramnegativer, oder insbesondere coryneformer Bakterien zugänglich. Konservierte Cysteinreste sind anhand von Sequenzalignments leicht feststellbar. Als nichtlimitierendes Beispiele für konservierte Cys-Reste in S-Adenosylmethionin Synthasen aus Bakterien sind Cys24 und Cys94 der Enzyms aus *C. glutamicum* zu nennen, welche in einer Vielzahl von Bakterien zu finden sind.

In einer bevorzugten Gruppe von erfindungsgemäßen Mutanten sind Cys24 und oder Cys94 (gemäß metK aus *C. glutamicum* ATCC 13032) durch eine von Cys verschiedene

Aminosäure, vorzugsweise Alanin, substituiert, wodurch die Enzymaktivität in obiger Weise verringert wird.

- 5 „Funktionale Äquivalente“ oder Analoga der konkret offenbarten Polypeptide sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Polypeptide, welche weiterhin die gewünschte biologische Aktivität, wie z.B. Substratspezifität, besitzen.

- 10 Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß insbesondere Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäure aufweisen aber trotzdem eine der oben genannten biologische Aktivität besitzen. "Funktionale Äquivalente" umfassen somit die durch eine oder mehrere Aminosäure-Additionen, -Substitutionen, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit dem erfindungsgemäßen
- 15 Eigenschaftsprofil führen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Reaktivitätsmuster zwischen Mutante und unverändertem Polypeptid qualitativ übereinstimmen, d.h. beispielsweise gleiche Substrate mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

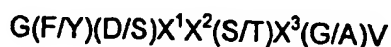
- 20 "Funktionale Äquivalente" umfassen natürlich auch Polypeptide welche aus anderen Organismen zugänglich sind, sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.

- 25 „Funktionale Äquivalente“ umfassen ebenfalls Fragmente, vorzugsweise einzelne Domänen oder Sequenzmotive, der erfindungsgemäßen Polypeptide, welche z.B. die gewünschte biologische Funktion aufweisen.

- 30 „Funktionale Äquivalente“ sind außerdem Fusionsproteine, welche ein der oben genannten Polypeptidsequenzen oder davon abgeleitete funktionale Äquivalente und wenigstens eine weitere, davon funktionell verschiedene, heterologe Sequenz in funktioneller N- oder C-terminaler Verknüpfung (d.h. ohne gegenseitigen wesentliche funktionelle Beeinträchtigung der Fusionsproteinteile) aufweisen. Nichtlimitierende Beispiele für derartige heterologe Sequenzen sind z.B. Signalpeptide, Enzyme, Immunoglobuline, Oberflächenantigene,
- 15 Rezeptoren oder Rezeptorliganden.

Erfindungsgemäß mit umfasste „funktionale Äquivalente“ sind Homologe zu den konkret offenbarten Proteinen. Diese besitzen wenigstens 20%, 30%, oder etwa 40%, 50 %, vorzugsweise wenigstens etwa 60 %, 65%, 70%, oder 75% insbesondere wenigstens 85 %, wie z.B. 90%, 95% oder 99%, Homologie zu einer der konkret offenbarten Sequenzen, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448.

Insbesondere sind Mutanten und funktionale Analoga bevorzugt, welche die charakteristische Teilsequenz



gemäß obiger Definition enthalten; wobei X^3 eine von Cys verschiedene, durch Mutation eingeführte Aminosäure, insbesondere Alanin, darstellt. X^3 entspricht Cys94 der metK Wildtyp-Sequenz von *C. glutamicum* (SEQ ID NO:16). X^2 steht vorzugsweise für Ala, Glu, Asp, Asn oder Arg; und X^1 steht vorzugsweise für Gly, Cys, Ser oder Ala.

Homologe der erfindungsgemäßen Proteine oder Polypeptide können durch Mutagenese erzeugt werden, z.B. durch Punktmutation oder Verkürzung des Proteins. Der Begriff "Homolog", wie er hier verwendet wird, betrifft eine variante Form des Proteins, die als Agonist oder Antagonist der Protein-Aktivität wirkt.

Homologe des erfindungsgemäßen Proteine können durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, wie z.B. Verkürzungsmutanten, identifiziert werden. Beispielsweise kann eine variierte Bank von Protein-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt werden, wie z.B. durch enzymatisches Ligieren eines Gemisches synthetischer Oligonukleotide. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller Homologer aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt werden, und das synthetische Gen kann dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen in einem Gemisch, die den gewünschten Satz an potentiellen Proteinsequenzen codieren. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind dem Fachmann bekannt (z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev.

Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

5 Zusätzlich können Banken von Fragmenten des Protein-Codons verwendet werden, um eine variierte Population von Protein-Fragmenten zum Screening und zur anschließenden Selektion von Homologen eines erfindungsgemäßen Proteins zu erzeugen. Bei einer Ausführungsform kann eine Bank von kodierenden Sequenzfragmenten durch Behandeln eines doppelsträngigen PCR-Fragmentes einer kodierenden Sequenz mit einer Nuklease unter Bedingungen, unter denen ein Nicking nur etwa einmal pro Molekül erfolgt, 10 Denaturieren der doppelsträngigen DNA, Renaturieren der DNA unter Bildung doppelsträngiger DNA, die Sense-/Antisense-Paare von verschiedenen genickten Produkten umfassen kann, Entfernen einzelsträngiger Abschnitte aus neu gebildeten Duplices durch Behandlung mit S1-Nuklease und Ligieren der resultierenden Fragmentbank in einen Expressionsvektor erzeugt werden. Durch dieses Verfahren kann eine Expressionsbank 15 hergeleitet werden, die N-terminale, C-terminale und interne Fragmente mit verschiedenen Größen des erfindungsgemäßen Proteins kodiert.

Im Stand der Technik sind mehrere Techniken zur Mutagenese von Genen bekannt: Coco, WM et al. 2001. DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved 20 enzymes. Nature Biotechnol. 19:354–359; DE 19953854; Leung DW et al. 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. Technique 1:11–15; Stemmer WPC 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. Proc. Natl. Acad. Sci USA 91:10747–10751; und US 5811238. Diese Verfahren sind zur Herstellung erfindungsgemäß 25 brauchbarer Mutanten einsetzbar.

Im Stand der Technik sind mehrere Techniken zum Screening von Genprodukten kombinatorischer Banken, die durch Punktmutationen oder Verkürzung hergestellt worden sind, und zum Screening von cDNA-Banken auf Genprodukte mit einer ausgewählten 30 Eigenschaft bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Screening der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese von erfindungsgemäßer Homologer erzeugt worden sind. Die am häufigsten verwendeten Techniken zum Screening großer Genbanken, die einer Analyse mit hohem Durchsatz unterliegen, umfassen das Klonieren der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren der geeigneten 35 Zellen mit der resultierenden Vektorenbank und Exprimieren der kombinatorischen Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten Aktivität die Isolation des Vektors, der das Gen codiert, dessen Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert. Recursive-

Ensemble-Mutagenese (REM), eine Technik, die die Häufigkeit funktioneller Mutanten in den Banken vergrößert, kann in Kombination mit den Screeningtests verwendet werden, um Homologe zu identifizieren (Arkin und Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331.

5 c) Erfindungsgemäße Polynukleotide

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Nukleinsäuresequenzen (einzeln- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen, wie z.B. cDNA und mRNA), kodierend für ein
10 erfindungsgemäßes metK-Enzym und deren funktionalen Äquivalenten, welche z.B. auch unter Verwendung künstlicher Nukleotidanaloga zugänglich sind.

Die Erfindung betrifft sowohl isolierte Nukleinsäuremoleküle, welche für erfindungsgemäße Polypeptide bzw. Proteine oder biologisch aktive Abschnitte davon kodieren, sowie
15 Nukleinsäurefragmente, die z.B. als Hybridisierungs sonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung von erfindungsgemäßer kodierenden Nukleinsäuren verwendet werden können.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem untranslatierte Sequenzen
20 vom 3'- und/oder 5'-Ende des kodierenden Genbereichs enthalten

Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch
25 rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.
30

Die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologer Sequenzen in anderen Zelltypen und Organismen verwendbar sind. Solche Sonden bzw. Primer umfassen
35 gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B. etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges hybridisiert.

Weitere erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO:21 und unterscheiden sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide, kodieren aber weiterhin für Polypeptide mit dem gewünschten Eigenschaftsprofil. Dies können Polynukleotide sein, die zu obigen Sequenzen in mindestens
5 etwa 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80% oder 90%, vorzugsweise in mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% der Sequenzpositionen identisch sind.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen
10 Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Allelvarianten, davon. Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotidsubstitutionen (d.h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.

15 Gegenstand der Erfindung sind auch die durch Sequenzpolymorphismen von den konkret offenbarten Nukleinsäuren abgeleiteten Moleküle. Diese genetischen Polymorphismen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund der natürlichen Variation existieren. Diese natürlichen Variationen bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 %
20 in der Nukleotidsequenz eines Gens.

Weiterhin umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, welchen mit oben genannten kodierenden Sequenzen hybridisieren oder dazu komplementär sind. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Banken auffinden und
25 gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Eine weitere Möglichkeit bietet die Transformation geeigneter Mikroorganismen mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Vektoren, die Vermehrung der Mikroorganismen und damit der Polynukleotide und deren anschließende Isolierung. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Polynukleotide auch
30 auf chemischem Wege synthetisiert werden.

Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide „hybridisieren“ zu können, versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische
35 Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen zu 70-100%, vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich

beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen versteht man beispielsweise in der Northern-Blot-Technik die Verwendung einer 50 – 70 °C, vorzugsweise 60 – 65 °C warmen Waschlösung, beispielsweise 0,1x SSC-Puffer mit 0,1% SDS (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0) zur Elution unspezifisch hybridisierter cDNA-Sonden oder Oligonukleotide. Dabei bleiben, wie oben erwähnt, nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander gebunden. Die Einstellung stringenter Bedingungen ist dem Fachmann bekannt und ist z.B. in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

d) Isolierung der kodierenden metK-Gene und anderer Gene

Die für das Enzym S-Adenosylmethionin-Synthase (EC 2.5.1.6) kodierenden metK Gene sind in an sich bekannter Weise isolierbar.

Zur Isolierung der metK-Gene oder auch anderer Gene anderer Organismen wird zunächst eine Genbank dieses Organismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern ausführlich beschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (198)) in λ -Vektoren angelegt wurde.

Zur Herstellung einer Genbank in E. coli können Cosmide, wie der Cosmidvektor SuperCos I (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84: 2160-2164), aber auch Plasmide, wie pBR322 (Bolivar; Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19: 259-268), verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so

wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74: 5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen, wie z. B. dem von Staden (Nucleic Acids Research (1986) 14,217-232), dem von Marck (Nucleic Acids Research (1988) 16, 1829-1836) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis (1998) 39, 74-97), untersucht werden.

- 10 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide für Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

- 20 Weiterhin ist bekannt, dass Änderungen am N- und/oder C- Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (1987) Journal of Bacteriology 169: 751-757, bei O'Regan et al. (1989) Gene 77: 237-251, bei Sahin-Toth et al. (1994) Protein Sciences 3: 240-247, bei Hochuli et al. (1988) Biotechnology 6: 1321-1325 und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

25

e) Erfindungsgemäß verwendete Wirtszellen

- Für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet man vorzugsweise coryneforme Bakterien, deren verringerte metK-Aktivität über wenigstens eine der folgenden Eigenschaften nachweisbar ist:

- 10 a) einen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm geringeren intrazellulären S-Adenosylmethionin Titer;
- b) eine geringere intrazelluläre S-Adenosylmethionin Synthase Konzentration (weniger S-Adenosylmethionin Synthase bezogen auf Gesamtprotein); oder
- 15 c) eine geringere intrazelluläre S-Adenosylmethionin Synthase Aktivität (weniger S-Adenosylmethionin Synthase Enzymaktivität bezogen auf S-Adenosylmethionin Synthase-Proteingehalt).

Sämtliche dieser Eigenschaften sind in einfacher Weise vom Fachmann, gegebenenfalls unter Heranziehung der vorliegenden Beschreibung, bestimmbar.

Weitere Gegenstände der Erfindung betreffen insbesondere als Wirtszelle dienende Mikroorganismen, insbesondere coryneforme Bakterien, die einen Vektor, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, der wenigstens ein metK Gen erfindungsgemäßer Definition trägt, enthalten oder in denen ein erfindungsgemäßes metK Gen mit verringerter Aktivität exprimiert ist.

- 5 Diese Mikroorganismen können schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Vorzugsweise sind dies coryneforme Bakterien, insbesondere der Gattung *Corynebacterium*. Aus der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Als Beispiele für geeignete Stämme coryneformer Bakterien sind solche der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), wie *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032,

- 20 *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806,
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870,
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539,
Corynebacterium melassecola ATCC 17965

- 5 oder
der Gattung *Brevibacterium*, wie
Brevibacterium flavum ATCC 14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC 14020 zu nennen;
10 oder davon abgeleitete Stämme, wie
Corynebacterium glutamicum KFCC10065
Corynebacterium glutamicum ATCC21608

- 5 welche ebenfalls die gewünschte Feinchemikalie oder deren Vorstufe(n) produzieren, aufgeführt. (KFCC = Korean Federation of Culture Collection; ATCC = American Type Culture Collection)

f) Durchführung der erfindungsgemäßen Fermentation

Erfindungsgemäß wurde festgestellt, dass coryneforme Bakterien nach Expression eines erfindungsgemäßen metK Gens in vorteilhafter Weise schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, produzieren.

Um die Aktivität oder Menge eines Enzyms, z.B. der S-Adenosylmethionin Synthase, metK, zu verringern, kann der Fachmann unterschiedliche Maßnahmen einzeln oder in Kombinationen ausführen. Durch Reduktion der Transkriptionshäufigkeit des Gens, das für das erfindungsgemäße Protein kodiert, kann die Konzentration des betreffenden Proteins gesenkt werden. Dies kann der Fachmann durch Veränderung oder Austausch der Promotor- oder Regulationsregion, sowie der Ribosomenbindungsstelle des kodierenden Gens erreichen. Stromab der kodierenden Region kann der Fachmann Terminatoren verändern oder Sequenzen einfügen, die zu einer verringerten Stabilität des Transkriptes führen. Diese, die Lebensdauer der mRNA verringernenden Maßnahmen ermöglichen, die Expression des zugehörigen Proteins, und damit seine Konzentration abzusenken.

Auf der Ebene des exprimierten Enzyms können fusionierte Sequenzen zu einer erhöhten Abbaurrate und damit ebenfalls zu einer Absenkung der Konzentration des Proteins führen. Außerdem kann der Fachmann durch gezielte oder ungerichtete Mutagenese des kodierenden Gens die Aktivität, die Substrataffinität und die Substratspezifität verändern. Enzyme können durch Mutationen in den korrespondierenden Genen derart in ihrer Aktivität beeinflusst werden, dass es zu einer teilweisen oder vollständigen Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion kommt. Beispiele für solche Mutationen sind dem Fachmann bekannt (Motoyama H. Yano H. Terasaki Y. Anazawa H. Applied & Environmental Microbiology. 67:3064-70, 2001, Eikmanns BJ. Eggeling L. Sahm H. Antonie van Leeuwenhoek. 64:145-63, 1993-94) Mutanten des Proteins können auch zu verringerter oder veränderter Homo- oder Heteromultimerisierung von Enzymkomplexen und damit ebenfalls zu einer Verschlechterung der enzymatischen Eigenschaften führen.

Solchermaßen veränderte Gene können entweder in Plasmiden oder bevorzugt im Chromosom integriert vorliegen. Dabei kann das ursprüngliche, nicht auf diese Art veränderte Gen noch zusätzlich vorhanden sein, bevorzugt aber gegen das veränderte Gen ausgetauscht sein.

Um die Aktivität eines Enzyms, z.B. der S-Adenosylmethionin Synthase (metK), gemessen in einem coryneformen Bakterium, zu verringern, kann es ausreichend sein, Gene, die für funktionale Äquivalente, wie künstlich hergestellte Mutanten oder natürliche Homologe aus anderen Organismen kodieren, zu exprimieren. Dabei kann das ursprüngliche Gen noch
5 zusätzlich vorhanden sein, bevorzugt aber gegen das veränderte oder homologe Gen ausgetauscht sein.

Zusätzlich kann es für die Produktion von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, durch Fermentation in coryneformen Bakterien, vorteilhaft sein, neben einer
10 Expression eines erfindungsgemäßen metK-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, des Cystein-Stoffwechselwegs, der Aspartatsemialdehyd-Synthese, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken.

15 So kann für die Herstellung von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, eines oder mehrere der folgenden Gene verstärkt sein:

- das für eine Aspartatkinase kodierende Gen lysC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 281),
- das für eine Aspartat-Semialdehyd kodierende Gen asd (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 282),
- 20 - das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Eikmanns (1992), Journal of
25 Bacteriology 174: 6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 725),
- 30 - das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3491),
- das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen metC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3061),
- das für die Cystathionin-Synthase kodierende Gen metH (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO.
5 1663),
- das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1110),

- das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase kodierende Gen metY (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 726),
- das für die Methylentetrahydrofolat-Reduktase kodierende Gen metF (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2379),
- 5 - das für die Phosphoserin-Aminotransferase kodierende Gen serC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 928)
- eines für die Phosphoserin-Phosphatase kodierende Gen serB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 334, DNA-SEQ NO. 467, DNA-SEQ NO. 2767)
- das für die Serine Acetyl-Transferase kodierende Gen cysE (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ
- 10 NO. 2818)
- das für die Cystein-Synthase kodierende Gen cysK (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2817),
- das für eine Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1306)

15

So kann für die Herstellung von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin in coryneformen Bakterien, vorteilhaft sein, gleichzeitig wenigstens eines der nachfolgenden Gene zu mutieren, so dass die korrespondierenden Proteine, verglichen mit nicht mutierten Proteinen, in geringerem Maße oder nicht durch einen Stoffwechselmetaboliten in ihrer

20 Aktivität beeinflusst werden oder so dass ihre spezifische Aktivität gesteigert wird:

- das für eine Aspartatkinase kodierende Gen lysC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 281),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- 15 - das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 725),
- das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3491),
- das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen metC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ
- 0 NO. 3061),
- das für die Methionin-Synthase kodierende Gen methH (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1663),
- das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1110),
- 5 - das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase kodierende Gen metY (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 726),

- das für die Methylentetrahydrofolat-Reduktase kodierende Gen metF (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2379),
- das für die Phosphoserin-Aminotransferase kodierende Gen serC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 928)
- 5 - eines für die Phosphoserin-Phosphatase kodierende Gen serB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 334, DNA-SEQ NO. 467, DNA-SEQ NO. 2767)
- das für die Serine Acetyl-Transferase kodierende Gen cysE (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2818)
- das für die Cystein-Synthase kodierende Gen cysK (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2817),
- 10 - das für eine Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1306)

Weiterhin kann es für die Produktion von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Expression eines der erfindungsgemäßen metK-Gene eines oder mehrere der folgenden Gene abzuschwächen, insbesondere deren Expression zu verringern, oder auszuschalten:

- das für die Homoserine-Kinase kodierende Gen thrB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3453)
- 20 - das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2328)
- das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3486)
- 15 - das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3494)
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3157)
- das für die Glucose-6-Phosphat-6-Isomerase kodierende Gen pgi (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 950)
- 10 - das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2873)
- das für die Dihydrodipicolinat Synthase kodierende Gen dapA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3476)
- das für die Dihydrodipicolinat Reduktase kodierende Gen dapB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3477)
- 5 - das für die Diaminopicolinat Decarboxylase kodierende Gen lysA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3451)

Weiterhin kann es für die Produktion von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Expression eines der erfindungsgemäßen metK-Gene in coryneformen Bakterien gleichzeitig wenigstens eines der folgenden Gene so zu mutieren, dass die enzymatische Aktivität des korrespondierenden Proteins teilweise oder
5 vollständig verringert wird:

- das für die Homoserine-Kinase kodierende Gen thrB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3453)
- das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO.
10 2328)
- das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3486)
- das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3494)
- 15 - das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3157)
- das für die Glucose-6-Phosphat-6-Isomerase kodierende Gen pgj (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 950)
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2873)
- 20 - das für die Dihydrodipicolinat Synthase kodierende Gen dapA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3476)
- das für die Dihydrodipicolinat Reduktase kodierende Gen dapB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3477)
- das für die Diaminopicolinat Decarboxylase kodierende Gen lysA (EP 1 108 790 A2; DNA-
25 SEQ NO. 3451)

Weiterhin kann es für die Produktion von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, neben der Expression eines erfindungsgemäßen metK-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid
30 Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Zur Erzielung einer Überexpression kann der Fachmann unterschiedliche Maßnahmen einzeln oder in Kombination ergreifen. So kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene
5 erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens

eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Methionin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

- 10 Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Biotechnology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der EP 0472869, in US 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991)), bei Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

20

Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte. Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen

- 25 Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer „operativen Verknüpfung“ versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Aktivierungssequenzen sowie Enhancer und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen. Geeignete regulatorische Sequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA
- 30 (1990).

Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für brauchbare Promotoren sind: die Promotoren, *ddh*, *amy*, *lysC*, *dapA*, *lysA* aus *Corynebacterium glutamicum*, aber auch gram-positive Promotoren, wie *SPO2* wie sie in *Bacillus Subtilis* and Its Closest Relatives, Sonenshein, Abraham L., Hoch, James A., Losick, Richard; ASM Press, District of Columbia, Washington und Patek M. Eikmanns B.J. Patek J. Sahm H. Microbiology. 142 1297-309, 1996 beschrieben sind, oder aber auch *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacIq-*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *SP6-*, *I-PR-* oder *I-PL-* Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Bevorzugt ist auch die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der *P_{P₁}*-Promotor. Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression negativ beeinflussen und dadurch verringern. So kann eine Abschwächung auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem schwache Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Abschwächung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verringert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem

starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

- 5 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors, einer geeigneten Shine-Dalgarno-Sequenz mit einer metK-Nukleotidsequenz sowie einem geeigneten Terminationssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, 1993, John Wiley & Sons, Incorporated, New York New York, PCR Methods, Gelfand, David
- 10 H., Innis, Michael A., Sinsky, John J. 1999, Academic Press, Incorporated, California, San Diego, ., PCR Cloning Protocols, Methods in Molecular Biology Ser., Vol. 192, 2nd ed., Humana Press, New Jersey, Totowa. T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene
- 15 Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

- Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem
- 20 geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind
- 25 außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

- Erfindungsgemäße metK Gene werden beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden
- 10 exprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren, wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren, wie z. B. pCLiK5MCS,
- 15 SEQ ID NO: 9, oder solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160) oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters '66, 119-124 (1990)) oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Sirnon et al., Bio/ Technology 1,784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145,69-73 (1994)), Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al. 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Andere Plasmidvektoren, wie z. B. pCLIK5MCS integrativ sacB, SEQ ID NO:12, können in gleicher Weise verwendet werden.

Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivan (Biotechnology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123,343-347 (1994)) beschrieben.

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zur Produktion von schwefelhaltige Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure oder Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin, Methanol oder Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure oder Milchsäure.

Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen.

Als Schwefelquelle für die Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, können anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise

Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.

Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegeben sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.

Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht läßt sich während der Anzucht durch Zugabe von basischen Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder sauren Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z. B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z. B. Umgebungsluft, in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die so erhaltenen, insbesondere L-Methionin enthaltenden, Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.

Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf ≥ 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

5

Die Fermentationsbrühe wird anschließend weiterverarbeitet. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden.

10

Anschließend kann die Fermentationsbrühe mit bekannten Methoden, wie z. B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Gefriertrocknung, Sprühtrocknung, Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren aufgearbeitet werden.

15

Es ist aber auch möglich die schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere L-Methionin, weiter aufzureinigen. Hierzu wird die produktthaltige Brühe nach dem Abtrennen der Biomasse einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Produkt oder die Verunreinigungen ganz oder teilweise auf dem Chromatographieharz zurückgehalten werden. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographiehärze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographiehärze und ihrer wirksamsten Anwendung bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

20

25

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindung(en) kann durch Techniken des Standes der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A.

30

et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

Die Erfindung wird nun anhand der folgenden nicht-limitierenden Beispiele näher
5 beschrieben:

Figur 1 zeigt die Ergebnisse eines radioaktiven metK Assays, durchgeführt mit Wildtypenzym bzw. C94A Mutante.

10

Beispiel 1

Herstellung des Vektors pCLiK5MCS

Zunächst wurden Ampicillinresistenz und Replikationsursprung des Vektors pBR322 mit den
15 Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2 mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

SEQ ID NO:1

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCGCGCCGGCCGGCCCGGTGTGAAATACCGCACAG-3'

20

SEQ ID NO:2

5'-TCTAGACTCGAGCGGCCGCGGCCGGCCTTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTCG-3'

Neben den zu pBR322 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer SEQ
25 ID NO:1 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen SmaI, BamHI, NheI und AclI und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:2 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, XhoI, NotI und DraI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode von Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla,
30 USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,1 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die stumpfen Enden des DNA-Fragmentes wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers miteinander ligiert und der Ligationsansatz nach
35 Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben (1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das
M/43138

Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK1.

Ausgehend vom Plasmid pWLT1 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:3 und SEQ ID NO:4 eine Kanamycin-Resistenzcassette amplifiziert.

SEQ ID NO:3:

5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGA-3'

SEQ ID NO:4:

5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGGCGAAGAACTCCAGCA-3'

Neben den zu pWLT1 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:3 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, SmaI, BamHI, NheI und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:4 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen AscI und NheI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode von Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 1,3 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und AscI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK1 wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und AscI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,1kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der

Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) und Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK2.

10

Der Vektor pCLiK2 wurde mit der Restriktionsendonuklease DraI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde ein ca. 2,3 kb großes Vektorfragment mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers religiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

20

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK3.

25

Ausgehend vom Plasmid pWLQ2 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:6 der Replikationsursprung pHM1519 amplifiziert.

30

SEQ ID NO:5:

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCCGCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO:6:

5'-GAGAGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGCCACGC-3'

35

Neben den zu pWLQ2 komplementären Sequenzen, enthalten die Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:6 Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease NotI. Die PCR

Reaktion wurde nach Standardmethode von Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,7 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK3 wurde ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease NotI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,3kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5.

25

Für die Erweiterung von pCLiK5 um eine „multiple cloning site“ (MCS) wurden die beide synthetischen, weitestgehend komplementären Oligonukleotide SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:8, die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen SwaI, XhoI, AatI, ApaI, Asp718, MluI, NdeI, SpeI, EcoRV, Sall, ClaI, BamHI, XbaI und SmaI enthalten, durch gemeinsames erhitzen auf 95°C und langsames abkühlen zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment vereinigt.

30

SEQ ID NO:7:

5'-TCGAATTTAAATCTCGAGAGGCCTGACGTCGGGCCCCGGTACCACGCGTCATATGACT
AGTTCCGGACCTAGGGATATCGTCGACATCGATGCTCTTCTGCGTTAATTAACAATTGGG
ATCCTCTAGACCCGGGATTAAAT-3'

5 SEQ ID NO:8:

5'-GATCATTAAATCCCGGGTCTAGAGGATCCCAATTGTTAATTAACGCAGAAGAGCATC
GATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAACTAGTCATATGACGCGTGGTACCGGGCCCGA
CGTCAGGCCTCTCGAGATTAAAT-3'

- 10 Der Vektor pCLiK5 wurde mit den Restriktionsendonuklease XhoI und BamHI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 5,0 kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des
- 15 Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem synthetischen Doppelsträngigen DNA-Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA)
- 20 transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

- Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus
- 25 überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5MCS.

- Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden
- 30 mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS ist als SEQ ID NO:9 aufgeführt.

- 35 Beispiel 2
Herstellung des Vektors pCLiK5MCS integrativ sacB

Ausgehend vom Plasmid pK19mob (Schäfer et al., Gene 145,69-73(1994)) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:11 das *Bacillus subtilis* sacB Gen amplifiziert.

5 SEQ ID NO:10:

5'-GAGAGCGGCCGCGATCCTTTTAAACCATCAC-3'

SEQ ID NO:11:

5'-AGGAGCGGCCGCGCATCGGCATTTTCTTTTGCG-3'

10

Neben den zu pK19mobsac komplementären Sequenzen, enthalten die Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:11 Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease NotI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode von Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 1,9 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK5MCS wurde ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease NotI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde ein ungefähr 2,4 kb großes Vektorfragment mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente *E.coli* XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klon wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5MCS integrativ sacB.

Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

- 5 Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS integrativ sacB ist als SEQ ID NO:12 aufgeführt.

Beispiel 3

Isolierung und Klonierung des metK Gens aus *C. glutamicum*

- 10 Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Die folgenden Oligonukleotidprimer wurden ausgehend von der metK Sequenz aus Großmann et al. (2000) FEMS Microbiology Letters 193:99-103 synthetisiert:

- 15 SEQ ID NO:13

5'-GAGAGCCCGGGAAGAAGGGCTGCGACCTCCTCAT -3'

und

SEQ ID NO:14

5'-CTCTCACGCGTCATATGCAGGTGAGGTAACCCCA -3'

20

Nach Standardmethoden von Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, und unter Einsatz der aufgeführten Oligonukleotidprimer, sowie Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde ein DNA Fragment von 1640 Basenpaaren aus der genomischen DNA von *C. glutamicum* amplifiziert.

25

Das Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen Mlu I und Sma I (Roche Diagnostics, Mannheim), die über die PCR-Oligonukleotidprimer eingebracht wurden, gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) aus der Agarose aufgereinigt.

30

- Der Vektor pCLiK5MCS, SEQ ID NO:9 wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen Sma I und Mlu I gespalten und mit alkalischer Phosphatase I (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Vektor und DNA Fragment wurden mit T4 DNA Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg) ligiert und nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben, in *E. coli* XL-1Blue (Fa. Stratagene) transformiert.

35

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Qiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS/metKwt ist als SEQ ID NO:15 aufgeführt.

Beispiel 4

10 Mutagenese des metK Gens aus *C. glutamicum*

Die gerichtete Mutagenese des metK Gens aus *C. glutamicum* wurde mit dem QuickChange Kit (Fa. Stratagene) und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Mutagenese wurde im Plasmid pCLiK5MCS/metKwt, SEQ ID NO:15 durchgeführt. Für den Austausch von Cystein 94 aus SEQ ID NO: 16 nach Alanin 94 wurden folgende Oligonukleotidprimer synthetisiert:

SEQ ID NO:17

5'- GATTTCGACGGACGCACCGCTGGCGTCTCAGTATCCATC -3'

20 und

SEQ ID NO:18

5'-GATGGATACTGAGACGCCAGCGGTGCGTCCGTCTGAATC -3'

Der Einsatz dieser Oligonukleotidprimer führt in SEQ ID NO:15 zu einem Austausch der Nukleotide in Position 1056 (von C nach G) und 1057 (von A nach C). Der resultierende Aminosäureaustausch Cys94Ala im metK Gen wurde nach Transformation und Plasmidpräparation durch Sequenzierungsreaktionen bestätigt. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pCLiK5MCS/metKC94A und ist als SEQ ID NO:19 aufgeführt.

10

Beispiel 5

SAM Synthetase (metK) Assay

C. glutamicum Stämme, die entweder mit dem Plasmid pCLiK5MCS/metKwt, SEQ ID NO: 15, oder mit dem Plasmid pCLiK5MCS/metKC94A, SEQ ID NO: 19 transformiert wurden, wurden in BHI/Glucose-Medium (37 g/l Brain Heart Infusion Fertigmedium, Fa. Difco, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 4% Glucose) bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 20 angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet wurde mit kalter physiologischer Kochsalzlösung

gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden 0,25 g feuchtes Zellpellet mit 1 mL Aufschlußpuffer (50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT) bei 4°C resuspendiert. In einem Ribolyser der Fa. Hybaid und in blauen Ribolyseröhrchen der Fa. Hybaid und bei einer Rotationseinstellung von 6,0 wurde die Bakteriensuspension dreimal für
5 jeweils 30 Sekunden lysiert. Das Lysat wurde durch 45minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Eppendorfsentrifuge geklärt und der Überstand 1:10 mit Wasser verdünnt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford, M. M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

Die enzymatische Aktivität der SAM Synthase wurde nach Markham, G.D. et al. (1983)
10 Methods in Enzymology 94: 219-222, mit folgenden Modifikationen bestimmt.

Reaktionsansätze von 100 µl mit 100 mM Tris pH 8,0, 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 1,2 mM L-Methionin, 10 mM ATP, 1 µl ³⁵S-L-Methionin, entsprechend 15,15 µCi (Amersham SJ204, spez. Aktivität 1 Ci/µmol) und H₂O ad 100 µl wurden mit 100 µg der jeweiligen Proteinlysate
15 gestartet und bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten wurden 10 µl Aliquots des Reaktionsansatzes entnommen und auf Eis mit 20 µl 50 mM EDTA gestoppt.

30 µl der abgestoppten Reaktion wurden auf Phosphocellulose Filtereinheiten (Fa. Pierce,
20 Nr. 29520) gegeben und bei 6.000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge für 1 Minute abzentrifugiert. Der Filter wurde zweimal mit 500 µl 75 mM Phosphorsäure gewaschen und dann in ein Zählröhrchen mit Szintillationsflüssigkeit gegeben. Die Radioaktivität des gebildeten S-Adenosylmethionins wird in einem Szintillationszähler (Fa. Beckman) bestimmt.

25 Die Messergebnisse sind in beiliegender Figur 1 dargestellt.

Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität des radioaktiven L-Methionins sowie der eingesetzten Proteinmenge läßt sich die Rate der S-Adenosylmethionin-Bildung aus der Zunahme der eingebauten Radioaktivität pro Zeiteinheit bestimmen. Ihre Einheit lautet µmol
30 S-Adenosylmethionin/min*mg Protein. Diese Rate kann zwischen Wildtypenzym und Mutantenzym verglichen werden.

Beispiel 6

Bestimmung des zellulären S-Adenosylmethionin Titers in *C. glutamicum*

5 Zur Bestimmung der zellulären Titer von S-Adenosylmethionin in *C. glutamicum* Stämmen, die entweder mit pCLiK5MCS/metKwt (SEQ ID NO:15), oder pCLiK5MCS/metKC94A (SEQ M/43138

ID NO:19) transformiert wurden, wurde wie folgt verfahren. Ein wie in Beispiel 5 erhaltenes Zellpellet, das mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen wurde, wurde mit Trichloressigsäure (200 µl TCA pro 0,1 g feuchtes Pellet) resuspendiert. Nach 5 Minuten auf Eis wurde die Suspension bei 4°C und 13.000 rpm für 5 min in einer Eppendorffzentrifuge geklärt. Der S-Adenosylmethionin Gehalt im Überstand wurde mittels HPLC bestimmt (Ionospher 5C Kationenaustauschersäule, 10 µl Injektionsvolumen; Laufmittel: 70% vol/vol 0,2 M Ammoniumformiat pH 4,0 30% vol/vol Methanol; UV-Detektion 260 nm; 40°C; Retentionszeit 8,5 Min.).

10 Tab.1. S-Adenosylmethionin-Titer

	mg/l
ATCC 13032 + metK	73,94
ATCC 13032 + metK C94A	47,36

Beispiel 7

15 Austausch des metK wt Gens in *C. glutamicum* durch metK C94A

Für den allelischen Austausch des metK Wildtypgens in *C. glutamicum* KFCC10065 durch die Mutante metK C94A wurde zunächst die metK C94A Sequenz aus SEQ ID NO:19 in pCLiK5MCS integrativ sacB (SEQ ID NO:12) kloniert. Dazu wurde das Plasmid pCLiK5MCS/metKC94A (SEQ ID NO:19) mit den Restriktionsendonukleasen Bgl II und Xho I (Fa. NEB, Schwalbach) gespalten. Das erhaltene Fragment der Größe 1962 Basenpaare wurde wie in Beispiel 3 beschrieben, gereinigt. Der Vektor pCLiK5MCS integrativ sacB wurde ebenfalls mit Bgl II und XhoI gespalten und wie in Beispiel 3 beschrieben, aufgereinigt. Vektor und Fragment wurden wie in Beispiel 3 beschrieben, ligiert, in *E.coli* XL-1Blue transformiert. Das Plasmid wurden gereinigt und nach Sequenzierung bestätigt. Das erhaltene Plasmid pCLiK5MCS integrativ sacB/metKC94A ist als SEQ ID NO:20 aufgeführt.

Das Plasmid pCLiK5MCS integrativ sacB/metKC94A wurde in *C. glutamicum* KFCC10065 mittels Elektroporation wie bei Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 beschrieben, transformiert. Modifikationen des Protokolls sind in DE 10046870 beschrieben. Die chromosomale Anordnung des metK-Lokus einzelner Transformanten wurde mit Standardmethoden durch Southernblot und Hybridisierung wie in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben, überprüft.

Dadurch wurde sichergestellt, daß es sich bei den Transformanten um solche handelt, die das transformierte Plasmid durch homologe Rekombination am metK-Lokus integriert haben. Nach Wachstum solcher Kolonien über Nacht in Medien, die kein Antibiotikum enthalten, werden solche Transformanten dann auf ein Saccharose-CM-Agarmedium (10% Saccharose) ausplattiert und bei 30°C für 24 Stunden inkubiert.

Da das im Vektor pCLiK5MCS integrativ sacB/metKC94A enthaltende sacB Gen Saccharose in ein toxisches Produkt umwandelt, können nur solche Kolonien anwachsen, die das sacB Gen durch einen zweiten homologen Rekombinationsschritt zwischen dem Wildtyp metK Gen und dem mutierten metKC94A Gen deletiert haben. Während der homologen Rekombination kann entweder das Wildtyp Gen, oder das mutierte Gen zusammen mit dem sacB Gen deletiert werden. Wenn das sacB Gen zusammen mit dem Wildtyp Gen entfernt wird, resultiert eine mutierte Transformante.

Anwachsende Kolonien wurden gepickt, ihre genomische DNA präpariert und das metK Gen mit zwei Methoden analysiert. Zum einen wurde der Austausch von zwei Nukleotiden, wie in Beispiel 4 beschrieben, genutzt. Mit Hilfe eines spezifischen PCR-Oligonukleotidprimers, der an seinem 3'-Ende zwischen beiden Allelen differenzieren kann und eines zweiten metK-spezifischen Oligonukleotidprimers konnten diagnostische PCR-Fragmente generiert werden. Zum anderen wurden bei etwa 100 Transformanten der metK-Lokus nach PCR-Amplifikation mit PCR-Oligonukleotidprimern, die stromauf, bzw. stromab der Mutation binden, sequenziert. Es wurden mehrere mutierte metK Klone erhalten. Ein solcher Klon wurde mit KFCC10065metKC94A bezeichnet. Die Aminosäuresequenz der Mutante C94A entspricht SEQ ID NO:22.

Beispiel 8

Herstellung von Methionin mit dem Stamm KFCC10065metKC94A

Der in Beispiel 6 hergestellte Stamm KFCC10065metKC94A wurde auf einer Agar Platte mit BHI-Medium (Difco) für 2 Tage bei 30°C angezogen. Die aufgewachsenen Zellen wurden in Saline von der Agarplatte suspendiert und mit einer OD 600nm von 1,5 in das Medium II überführt. Das Medium II wurde wie folgt zusammengesetzt.

Medium IIA

0.6g/l KH_2PO_4

0.4g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

25g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

40g/l Rohrzucker

60g/l Melasse

Das so angesetzte Medium wurde mit NH_4OH auf pH 7,8 eingestellt und bei 120°C für 30 min sterilisiert.

Medium IIB:

0.3mg/l Thiamin*HCl

1mg/l Biotin

10 2mg/l FeSO_4

2mg/l MnSO_4

0.1mg/l Vit.B12

Medium IIB wurden separat angesetzt, durch Filtration sterilisiert und dem Medium IIA zugefügt. Beide Bestandteile IIA und IIB ergeben zusammen das Medium II.

Vom Medium II (= IIA+B) wurden 10ml in einem 100ml Erlenmyerkolben mit 0,5g sterilisiertem CaCO_3 mit Zellen des oben genannten Stamms versetzt, für 72h auf einem Orbitalschüttler mit 200 Upm bei 30°C inkubiert.

20

Gebildetes Methionin in der Kulturbrühe wurde mit Hilfe der Aminosäuresäure-Bestimmungsmethode von Agilent auf einer Agilent 1100 Series LC System HPLC bestimmt. Eine Vorsäulenderivatisierung mit Ortho-Phthalaldehyd erlaubt die Quantifizierung der gebildeten Aminosäuren, die Auftrennung des Aminosäuregemisch findet auf einer Hypersil

25 AA-Säule (Agilent) statt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung wenigstens einer schwefelhaltigen
Feinchemikalie, welches folgende Schritte umfasst:
 - 5 a) Fermentation einer die gewünschte schwefelhaltige Feinchemikalie
produzierenden coryneformen Bakterienkultur, wobei in den coryneformen
Bakterien zumindest eine Nukleotidsequenz exprimiert wird, welche für ein
Protein mit veränderter S-Adenosylmethionin Synthase (metK) –Aktivität kodiert;
 - 10 b) Anreicherung der schwefelhaltigen Feinchemikalie im Medium und/oder in den
Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der schwefelhaltigen Feinchemikalie.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die schwefelhaltige Feinchemikalie L-Methionin
umfasst.
- 15 3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man mutierte
coryneforme Bakterien mit, im Vergleich zum nichtmutierten Wildtyp, verringerter
metK Aktivität einsetzt.
- 20 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das mutierte
coryneforme Bakterium außerdem eine, im Vergleich zum nichtmutierten Wildtyp,
verbesserte metY Aktivität und/oder eine gesteigerte L-Methionin-Menge aufweist.
- 25 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die metK-kodierende
Sequenz eine kodierende Nukleotidsequenz ist, welche für ein Protein mit
verringertem metK-Aktivität kodiert, in welchem wenigstens ein Cysteinrest des
Wildtypproteins substituiert ist.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die metK-kodierende Sequenz eine kodierende
Nukleotidsequenz ist, die für ein Protein mit metK-Aktivität kodiert, welches folgende
Aminosäureteilsequenz aufweist:

$$G(F/Y)(D/S)X^1X^2(S/T)X^3(G/A)V$$

35 worin
X¹ und X² unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure stehen;

und

X³ für eine von Cys verschiedene Aminosäure steht.

- 5 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die metK-kodierende Sequenz für ein Protein mit metK-Aktivität kodiert, wobei das Protein eine Aminosäuresequenz von Val1 bis Ala407 gemäß SEQ ID NO: 22 oder eine dazu homologe Aminosäuresequenz, welche für ein Protein mit funktionaler Äquivalenz steht, umfasst.
- 10 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die kodierende metK-Sequenz eine in coryneformen Bakterien replizierbare oder eine stabil in das Chromosom integrierte DNA oder eine RNA ist.
- 15 9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man
a) einen mit einem Plasmidvektor transformierten Bakterienstamm einsetzt, der wenigstens eine Kopie der mutierten metK-Sequenz unter der Kontrolle regulativer Sequenzen trägt, oder
b) einen Stamm einsetzt, in dem die mutierte metK-Sequenz in das Chromosom des Bakteriums integriert wurde.
- 20 10. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man Bakterien fermentiert, in denen zusätzlich wenigstens ein weiteres Gen des Biosyntheseweges der gewünschten schwefelhaltigen Feinchemikalie verstärkt ist.
- 25 11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man Bakterien fermentiert, in denen wenigstens ein Stoffwechselweg zumindest teilweise ausgeschaltet sind, der die Bildung der gewünschten schwefelhaltigen Feinchemikalie verringert.
- 30 12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man coryneforme Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines der Gene, ausgewählt unter
a) dem für eine Aspartatkinase kodierenden Gen lysC,
b) dem für eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase kodierenden Gen asd
35 c) dem für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierenden Gen gap,

- d) dem für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierenden Gen pgk,
e) dem für die Pyruvat Carboxylase kodierenden Gen pyc,
f) dem für die Triosephosphat Isomerase kodierenden Gen tpi,
g) dem für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierenden Gen metA,
5 h) dem für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierenden Gen metB,
i) dem für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierenden Gen metC,
j) dem für die Methionin-Synthase kodierenden Gen meth
k) dem für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierenden Gen glyA,
l) dem für die O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase kodierenden Gen metY,
10 m) dem für die Metylentetrahydrofolat-Reduktase kodierenden Gens metF Gen,
n) dem für die Phosphoserin-Aminotransferase kodierenden Gens serC Gen, das
für die kodiert,
o) dem für die Phosphoserin-Phosphatase kodierenden Gens serB,
p) dem für die Serin Acetyl-Transferase kodierenden Gens cysE,
15 q) dem für die Cystein-Synthase kodierenden Gen cysK, und
r) dem für die Homoserin-Dehydrogenase kodierenden Gens hom
überexprimiert ist; und/oder
in denen gleichzeitig wenigstens eines dieser Gene so mutiert ist, dass das
korrespondierende Protein verglichen mit dem nicht mutierten Protein in geringerem
20 Maße oder nicht mehr durch einen Stoffwechselmetaboliten in seiner Aktivität
beeinflusst wird, oder dass dessen spezifische Aktivität gesteigert wird
13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man coryneforme
Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines der Gene, ausgewählt
25 unter
a) dem für die Homoserine-Kinase kodierenden Gen thrB,
b) dem für die Threonin Dehydratase kodierenden Gen ilvA,
c) dem für die Threonin Synthase kodierenden Gen thrC
d) dem für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierenden Gen ddh
30 e) dem für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierenden Gen pck;
f) dem für die Glucose-6-Phosphat-6-Isomerase kodierenden Gen pgi,
g) dem für die Pyruvat-Oxidase kodierenden Gen poxB,
h) dem für die Dihydrodipicolinat Synthase kodierenden Gen dapA,
i) dem für die Dihydrodipicolinat Reduktase kodierenden Gen dapB; oder
35 j) dem für die Diaminopicolinat Decarboxylase kodierenden Gen lysA

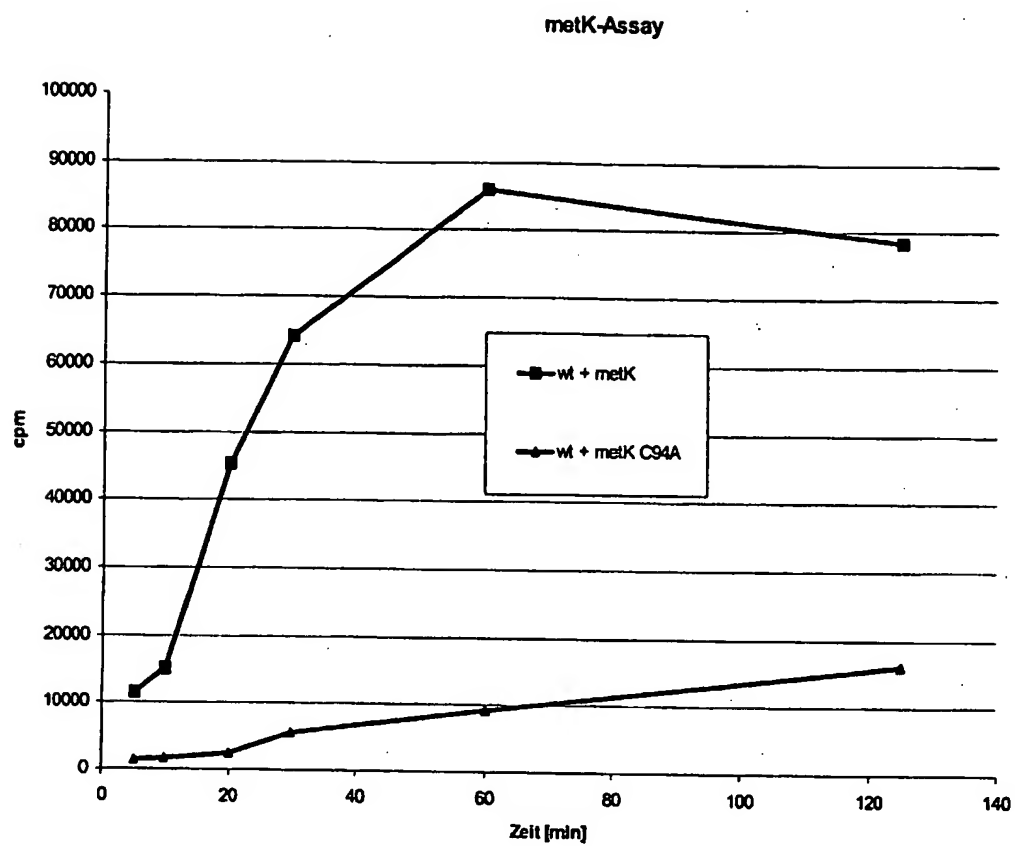
abschwächt ist; und /oder

wobei man coryneforme Bakterien fermentiert, in denen gleichzeitig wenigstens eines dieser Gene so mutiert ist, so dass die enzymatische Aktivität des korrespondierenden Proteins teilweise oder vollständig verringert wird.

- 5
14. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.
- 10
15. Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, welches folgende Schritte umfasst
- 15
- a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus gemäß der Definition in einem der vorhergehenden Ansprüche in einem Fermentationsmedium;
 - b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe;
 - c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und
 - d) Trocknung der gemäß b) und/oder c) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.
- 20
16. Isoliertes Polynukleotid gemäß der Definition in einem der Ansprüche 5 bis 7, das für ein Polypeptid mit verringerter metK-Aktivität kodiert.
- 25
17. MetK-Mutante mit verringerter Aktivität, welches von einem Polynukleotid nach Anspruch 16 kodiert wird.
18. Rekombinante coryneforme Bakterien, die ein mutiertes metK Gen, umfassend eine Polynukleotidsequenz gemäß der Definition in einem der Ansprüche 5 bis 7, exprimieren.
- 30
19. Rekombinante coryneforme Bakterien nach Anspruch 18 welche das metK-Wildtypenzym nicht mehr exprimieren.
20. Rekombinante coryneforme Bakterien gemäß Anspruch 19, welche im Vergleich zum korrespondierenden Wildtypstamm wenigstens eines der folgenden Merkmale:
- 35
- a) geringeren intrazellulären S-Adenosylmethionin Titer

- b) geringere intrazelluläre S-Adenosylmethionin Synthase Konzentration, oder
c) geringere Aktivität der S-Adenosylmethionin Synthase, bestimmt anhand der S-Adenosylmethionin Bildungsrate;
und zusätzlich gegebenenfalls wenigstens eines der folgenden Merkmale:
5 d) verbesserte metY Aktivität, oder
e) gesteigerte L-MethioninMenge.
aufweisen.
21. Expressionskonstrukt, enthaltend unter der Kontrolle einer regulativen
10 Nukleotidsequenz die kodierende Sequenz für eine metK-Mutante gemäß der
Definition in einem der Ansprüche 5 bis 7.

1/1

Fig.1

SEQUENCE LISTING

5 <110> BASF Aktiengesellschaft

10 <120> METK

15 <130> M/43138

<160> 23

20 <170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 52

<212> DNA

30 <213> Künstliche Sequenz

35 <400> 1
cccgggatcc gctagcggcg cgccggccgg cccggtgtga aataccgcac ag 52

40 <210> 2

<211> 53

<212> DNA

45 <213> Künstliche Sequenz

50 <400> 2
tctagactcg agcggccgcg gccggccttt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53

<210> 3

55 <211> 47

<212> DNA

60 <213> Künstliche Sequenz

5 <400> 3
gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcgga 47

10 <210> 4
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

15

20 <400> 4
gagaggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

25 <210> 5
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

30

35 <400> 5
gagagggcgg ccgcgcaaag tcccgcttcg tgaa 34

40 <210> 6
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

45 <400> 6
gagagggcgg ccgctcaagt cggcgaagcc acgc 34

50 <210> 7
 <211> 140
 <212> DNA

55 <213> Künstliche Sequenz

 <400> 7

	tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggta ccacgcgtca tatgactagt	60
	tcggacctag ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcg ttaattaaca attgggatcc	120
5	tctagaccg ggatttaa.	140
	<210> 8	
10	<211> 140	
	<212> DNA	
15	<213> Künstliche Sequenz	
	<400> 8	
20	gatcatttaa atccccggtc tagaggatcc caattgttaa ttaacgcaga agagcatcga	60
	tgctgacgat atccctaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gcccgacgtc	120
	aggcctctcg agatttaa	140
25	<210> 9	
	<211> 5091	
30	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
35	<400> 9	
	tcgattttaa tctcgagagg cctgacgctg gggccggtag cagcgctcat atgactagtt	60
40	cggacctagg gatatcgctg acatcgatgc tcttctgctg taattaacaa ttgggaccc	120
	ctagaccg gatttaaatt gctagcgggc tgctaaagga agcggaaacac gtagaaagcc	180
	agtccgcaga aacggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat ctggacaagg	240
45	gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgacgtg ggcttacatg gcgatagcta	300
	gactgggagg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc gccctctggt	360
50	aagggtggga agccctgcaa agtaaaactg atggctttct tgccgccaag gatctgatgg	420
	cgcaggggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcat gattgaacaa	480
	gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg	540
55	gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggagc	600
	ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca	660
	gcgcggctat cgtggctggc cagcagggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgct	720

	actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca	780
5	tctcaccttg ctccctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat	840
	acgcttgatc cggtacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca	900
	cgtactcgga tggaagccgg tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg	960
10	ctcgcgccag ccgaactggt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgcgg cgaggatctc	1020
	gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct	1080
15	ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggt	1140
	acccgtgata ttgctgaaga gcttgccggc gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac	1200
	ggatcgcgg ctcccgatcc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagtcttc	1260
20	tgagcgggac tctgggggtc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag	1320
	atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcggt ttccgggacg	1380
25	ccggctggat gatccctcag cgcggggatc tcatgtgga gttcttcgcc cacgctagcg	1440
	gcgcgccggc cggcccggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac	1500
	aggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctcgctc gctgcggcga	1560
30	gcggtatcag ctcaactcaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca	1620
	ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcggtg	1680
35	ctggcggttt tccataggct ccgccccct gacgagcacc acaaaaatcg acgctcaagt	1740
	cagagggtgc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc	1800
	ctcgtgcgct ctccctgttc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct	1860
40	tcgggaagcg tggcgcttc tcatagctca cgctgtagg atctcagttc ggtgtaggtc	1920
	gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta	1980
45	tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca	2040
	gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag	2100
	tggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag	2160
50	ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac caccgctggt	2220
	agcggtggtt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa	2280
55	gatcccttga tcttttctac ggggtctgac gtcagtgga acgaaaactc acgtaaggg	2340
	attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa ggccggccgc	2400
	ggccgcgcaa agtcccgctt cgtgaaaatt ttcgtgccgc gtgattttcc gccaaaaact	2460

	ttaacgaacg ttcgttataa tgggtgcatg accttcacga cgaagtacta aaattggccc	2520
	gaatcatcag ctatggatct ctctgatgtc gcgctggagt ccgacgcgct cgatgctgcc	2580
5	gtcgatttaa aaacggtgat cggatttttc cgagctctcg atacgacgga cgcgccagca	2640
	tcacgagact gggccagtgc cgcgagcgac ctagaaactc tcgtggcgga tcttgaggag	2700
10	ctggctgacg agctgcgtgc tcggccagcg ccaggaggac gcacagtagt ggaggatgca	2760
	atcagttgcg cctactgctg tggcctgatt cctccccggc ctgaccgcg aggacggcgc	2820
	gcaaaatatt gctcagatgc gtgtcgtgcc gcagccagcc gcgagcgcg caacaaacgc	2880
15	cacgccgagg agctggaggc ggctaggctc caaatggcgc tggaagtgcg tccccgagc	2940
	gaaatttttg ccatggctgt cacagagctg gaagcggcag cgagaattat cgcgatcgtg	3000
20	gcggtgcccc caggcatgac aaacatcgta aatgccgcgt ttcgtgtgcc gtggccgccc	3060
	aggacgtgtc agcgcgcga ccacctgcac cgaatcggca gcagcgtcgc gcgtcgaaaa	3120
	agcgcacagg cggcaagaag cgataagctg cacgaatacc tgaaaaatgt tgaacgcccc	3180
25	gtgagcggta actcacaggg cgtcggctaa ccccgagtc aaacctggga gaaagcgtc	3240
	aaaaatgact ctacgggatt cacgagacat tgacacaccg gcctggaaat tttccgctga	3300
30	tctgttcgac acccatcccc agctcgcgct gcgatcacgt ggctggacga gcgaagaccg	3360
	ccgcgaattc ctcgctcacc tgggcagaga aaatttccag ggcagcaaga cccgcgactt	3420
	cgccagcgct tggatcaaag acccggacac ggagaaacac agccgaagtt ataccgagtt	3480
35	ggttcaaaat cgcttgcccc gtgccagtat gttgctctga cgcacgcgca gcacgcagcc	3540
	gtgcttgctc tggacattga tgtgccgagc caccaggccg gcgggaaaat cgagcacgta	3600
40	aaccccgagg tctacgcgat tttggagcgc tgggcacgcc tggaaaaagc gccagcttgg	3660
	atcggcgtga atccactgag cgggaaatgc cagctcatct ggctcattga tccggtgtat	3720
	gccgcagcag gcatgagcag cccgaatatg cgctgctgg ctgcaacgac cgaggaaatg	3780
45	acccgcgttt tcggcgtga ccaggctttt tcacataggc tgagccgtgg ccaactgcact	3840
	ctccgacgat cccagccgta ccgctggcat gccagcaca atcgcgtgga tcgcctagct	3900
50	gatcttatgg aggttgctcg catgatctca ggcacagaaa aacctaaaa acgctatgag	3960
	caggagtttt ctacgggacg ggcacgtatc gaagcggcaa gaaaagccac tgcggaagca	4020
	aaagcacttg ccacgcttga agcaagcctg ccgagcgccg ctgaagcgtc tggagagctg	4080
55	atcgacggcg tccgtgtcct ctggactgct ccagggcgct ccgccgtga tgagacggct	4140
	tttcgccacg ctttgactgt gggataccag ttaaaagcgg ctggtgagcg cctaaaagac	4200
	accaagggtc atcgagccta cgagcgtgcc tacaccgtcg ctcaggcggt cggaggaggc	4260

5 cgtgagcctg atctgccgcc ggactgtgac cgccagacgg attggccgag acgtgtgcgc 4320
 ggctacgtcg ctaaaggcca gccagtcgtc cctgctcgtc agacagagac gcagagccag 4380
 ccgaggcgaa aagctctggc cactatggga agacgtggcg gtaaaaaggc cgcagaacgc 4440
 tggaaagacc caaacagtga gtacgcccga gcacagcgag aaaaactagc taagtccagt 4500
 10 caacgacaag ctaggaaagc taaaggaaat cgcttgacca ttgcagggtg gtttatgact 4560
 gttgaggggag agactggctc gtggccgaca atcaatgaag ctatgtctga atttagcgtg 4620
 15 tcacgtcaga ccgtgaatag agcacttaag gtctgcgggc attgaacttc cacgaggacg 4680
 ccgaaagctt ccagtaaat gtgccatctc gtaggcagaa aacggttccc ccgtagggtc 4740
 tctctcttgg cctcctttct aggtcgggct gattgtctct gaagctctct aggggggctc 4800
 20 acaccatagg cagataacgt tccccaccgg ctgcctcgt aagcgacaa ggactgctcc 4860
 caaagatctt caaagccact gccgcgactg ccttcgcgaa gccttgcccc gcggaaattt 4920
 25 cctccaccga gtctgtgcac accttatgc caagcttctt tcaccetaaa ttcgagagat 4980
 tggattctta ccgtggaaat tcttcgcaaa aatcgtcccc tgatcgccct tgcgacgttg 5040
 gcgtcgggtg cgctgggtgc gcttggcttg accgacttga tcagcgggcg c 5091
 30
 <210> 10
 <211> 33
 35 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 40
 <400> 10
 gagagcggcc gccgatcctt tttaacccat cac 33
 45 <210> 11
 <211> 32
 <212> DNA
 50 <213> Künstliche Sequenz
 55 <400> 11
 aggagcggcc gccatcggca ttttcttttg cg 32

<210> 12

<211> 4323

5 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

10

<400> 12

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagtctg gacctaggga 60
tategtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agacccggga 120
15 tttaaatcgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 180
cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc 240
20 gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcgggt 300
ttatggacag caagcgaacc ggaattgcc a gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag 360
ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca 420
25 agatctgac aagagacagg atgaggatcg ttctgcata ttgaacaaga tggattgcac 480
gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca 540
30 atcggctgct ctgatgccgc cgtgttcggg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt 600
gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg 660
tggttgccca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgctac tgaagcggga 720
35 agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcacc tcaccttgct 780
cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg 840
40 gctacctgcc cattcgacca ccaagcga aa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg 900
gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 960
gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat 1020
45 ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggc gcttttcttg attcatcgac 1080
tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt 1140
50 gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct 1200
cccgatcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc 1260
tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca 1320
55 ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga 1380
tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcccc cgctagcggc gcgccggccg 1440

gcccgtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 1500
gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1560
5 cactcaaagg cggtaatcag gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1620
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1680
10 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1740
aaccgcagac gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1800
cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc ggaagcgtg 1860
15 gcgctttctc atagctcacg ctgtaggat ctcagttcgg tgtaggctgt tcgctccaag 1920
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgctcag ccgcaccgt gcgccttacc cggtaactat 1980
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 2040
20 aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac 2100
tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 2160
25 ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 2220
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2280
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 2340
30 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaagg ccggccgagg ccgccatcgg 2400
cattttcttt tgcgttttta tttgttaact gttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct 2460
35 ttgacaacag atgttttctt gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat 2520
tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct 2580
ttcgcttgag gtacagcgaa gtgtgagtaa gtaaagggtta catcgttagg atcaagatcc 2640
40 atttttaaca caaggccagt tttgttcagc ggcttgatg ggccagttaa agaattagaa 2700
acataaccaaa gcatgtaaat atcgttagac gtaatgccgt caatcgatcat ttttgatccg 2760
45 cgggagtcag tgaacaggta ccatttgccg ttcattttaa agacgttcgc gcgttcaatt 2820
tcactgttta ctgtgttaga tgcaatcagc ggtttcatca cttttttcag tgtgtaatca 2880
tcgttttagct caatcatacc gagagcgccg tttgctaact cagccgtgcg ttttttatcg 2940
50 ctttgacaaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct 3000
ttgttaaata aagattcttc gccttggtag ccatcttcag ttccagtgtt tgcttcaaat 3060
55 actaagtatt tgtggccttt atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atggttgctg 3120
cctgagctgt agttgccttc atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt tttccgtca 3180
ccgtcaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct 3240

	gatacggttaa cttgtgcagt tgtcagtggt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca	3300
5	gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaatgtgg ctgaacctga ccattcttgt	3360
	gtttggtctt ttaggataga atcatttgca tcgaatttgt cgctgtcttt aaagacgcgg	3420
	ccagcgtttt tccagctgtc aatagaagtt tcgccgactt tttgatagaa catgtaaadc	3480
10	gatgtgtcat ccgcattttt aggatctccg gctaatagcaa agacgatgtg gtagccgtga	3540
	tagtttgca cagtgccgtc agcggtttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct	3600
15	tttgagaag agatattttt aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca	3660
	tttttttgct gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat	3720
	gtttccttat atggcttttg gttcgtttct ttcgcaaagc cttgagttgc gccctctgcc	3780
20	agcagtgcgg tagtaaaggt taatactggt gcttgttttg caaacttttt gatgttcac	3840
	gttcatgtct ccttttttat gtactgtgtt agcgggtctgc ttcttcagc cctcctgttt	3900
25	gaagatggca agttagttac gcacaataaa aaaagacctt aaatatgtaa ggggtgacgc	3960
	caaagtatac actttgccct ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac	4020
	ccgcgcgatt tacttttcga cctcattcta ttagactctc gtttggttg caactggtct	4080
30	attttcctct tttgtttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga	4140
	actaaaaaat ctatctgttt cttttcatc tctgtatttt ttatagtctc tgttgcatgg	4200
35	gcataaagtt gcctttttta tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa	4260
	taatagtga cggcaggat atgtgatggg ttaaaaagga tcggcgcccg ctcgatttaa	4320
	atc	4323
40	<210> 13	
	<211> 34	
45	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
50	<400> 13	
	gagagcccgg gaagaagggc tgcgacctcc tcat	34
55	<210> 14	
	<211> 34	

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

5

<400> 14

ctctcacgcg tcatatgcag gtgaggtaac ccca

34

10

<210> 15

<211> 6631

15

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

20

<400> 15

cgcgatcatat gcaggtgagg taaccccaaa agaggtaaaa cccgcgccac cgacttttca 60

25

ggagcgggga cgcgggtttt tgccatgaat ccgaagatac tacatcagat ttttaggcca 120

acttgagggc tgcgcgaagt tcataacgc ggtcgatagc ctccaagga aggtccaaat 180

cagtgcgacc aaagtggccg taggcagcag tgtcagcgta gatcggacga agcagatcaa 240

30

gctcacggat aattgctgct ggacgcaggt caaagacctc caacacggca gcctgaatct 300

gctcgctgct caggccttcc ttgttggtgt caaaggtttc aacgtaaagt ccgactggct 360

35

ttgcgcgtcc aatggcgtat gcaacctgaa cttcagcgcg atcagcaagg cctgctgcca 420

cgatgttctt tgctacccaa cgcattggcg atgcagcaga gcggtccacc ttgcttggaat 480

ccttaccgga gaatgctcca ccaccatggc gagccatgcc accgtaggta tccacgatga 540

40

tcttgcgccc ggtcagaccc gcatcaccca tggggccacc cagaatgaag gaacctgaag 600

ggttgatcaa cagggtgatc tcaccggttg ccagatcctc aatgcctgcg tctttgatta 660

45

cccaatcaat gacgtgttcg cgcagttggg tttccaacca tgcacggtca acttctgggt 720

cgtgctgggt ggagatgaca acggtatcca ggtggctagg gcggtcttgc gcatcgtatg 780

cgaagggtgac ctgggttttt ccgtctggac gcaggtgagg aacgatgccc tctttacgaa 840

50

cctgggtcag acgacgtgac agtcggtgcg ccaacgcgat aggaagaggc atgtactctt 900

cggtttcggt ggtggcgtag ccgaacatca ggccctggtc gccagacct gcgcgggtcg 960

55

cttcttcaac gtgcgcgttg gtgcgggctt cgtcggagtt atccacgccc tcagcgattt 1020

cctgggactg ctcaccgatg gatactgaga cgccacaggt gcgtccgctg aatccaacct 1080

cagaggagtt gaatccgatt tcgatgagct tgttgcggaac taattgaggg atctctacgt 1140

aagcgctggt acggacctcg ccaacaacat ggacgattcc ggtggtgacc acagtttcca 1200
ctgcgacgcg cgactgcgga tctttttcga gcagcgctc caaaatggta tcggaaatag 1260
5 catcacatat tttgtctgga tgtccctcag ttacagattc actggtgaac aaacggacgg 1320
cggttggtg agccacaaat acccttcttt cgaagaagtt gagaataaat agtcttaaat 1380
10 aaaaaaac aatatagacc aagctgtcta aaactgcaat gtcagtggc tagctggatt 1440
tttctagact tcgcgatacg ccagtgccgc gtcccaaatt tgcgcagcaa cctcgatttt 1500
gctgccgtgc tccacatcga ctaccccacc gtgagcatcc aaaatccagc cctcattgtg 1560
15 cttttgcccc aacactttgc ccatgcccac ctcatcac atgaggaggt cgcagccctt 1620
cttcccgga tttaaatcgc tagcgggctg cttaaaggag cggaacacgt agaaagccag 1680
tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaagga 1740
20 aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 1800
ctgggcgggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa 1860
25 ggttggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg 1920
caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga 1980
tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 2040
30 acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc 2100
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 2160
35 gcggtatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgctac 2220
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgcg gggcaggatc tcctgtcate 2280
tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 2340
40 gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcgagcacg 2400
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 2460
45 cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt 2520
cgtgacctat ggcatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttcttg 2580
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgtat caggacatag cgttggtac 2640
50 ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttctcgc tgetttacgg 2700
tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg 2760
55 agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcagcgc ccaacctgcc atcacgagat 2820
ttcgattcca ccgcgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc 2880
ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcccc cgtagcggc 2940

ggcgcggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag 3000
 5 ggcgtcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 3060
 ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 3120
 aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 3180
 10 ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3240
 gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3300
 15 cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 3360
 gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtag ctcagttcgg tgtaggtcgt 3420
 tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttate 3480
 20 cggtaactat cgtcttgagt ccaaccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3540
 cactggtaac aggattagca gagcgaggtg tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg 3600
 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc 3660
 25 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 3720
 cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga 3780
 30 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat 3840
 tttggcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaagg ccggccgcgg 3900
 ccgcgcaaag tcccgttcg tgaaaatttt cgtgccgctg gattttccgc caaaaacttt 3960
 35 aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccgga 4020
 atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt 4080
 40 cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc 4140
 acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct 4200
 ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat 4260
 45 cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gaccgcgag gacggcgcg 4320
 aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca 4380
 50 cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga 4440
 aattttggcc atggctgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc 4500
 ggtgccccga ggcattgaaa acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgccag 4560
 55 gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag 4620
 cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt 4680

gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgctcaa 4740
 aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgac 4800
 5 tgttcgacac ccattcccag ctccgctgac gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc 4860
 gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg 4920
 10 ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagtat accgagttgg 4980
 ttcaaaatcg cttgcccggg gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt 5040
 gcttgctcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 5100
 15 ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggtat 5160
 cggcggtgaat ccactgagcg ggaaatgcc gctcatctgg ctcatgac cgggtgatgc 5220
 cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac 5280
 20 ccgcgttttc ggcgctgacc aggttttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5340
 ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga 5400
 25 tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca 5460
 ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa 5520
 agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg gagagctgat 5580
 30 cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgctgc gcccgctgat agacggcttt 5640
 tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac 5700
 35 caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg gaggaggccg 5760
 tgagcctgat ctgccgcggg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg 5820
 ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtag acagagacgc agagccagcc 5880
 40 gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggg aaaaaggccg cagaacgctg 5940
 gaaagaccca aacagtgagt acgcccagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 6000
 45 acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggt ttatgactgt 6060
 tgagggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 6120
 acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc 6180
 50 gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcgt aggcagaaaa cggttcccc gtagggtctc 6240
 tctcttgccc tcctttctag gtcgggctga ttgctctga agctctctag gggggctcac 6300
 55 accataggca gataacgttc cccaccggct cgcctcgtaa gcgcacaagg actgctccca 6360
 aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttcgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc 6420
 tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcc agcttcttcc accctaaatt cgagagattg 6480

gattcttacc gtggaattc ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc 6540
 5 gtcggtgccg ctggttgccg ttggcttgac cgacttgatc agcggccgct cgatttaa 6600
 ctcgagaggc ctgacgtcgg gcccggtacc a 6631

<210> 16
 10 <211> 407
 <212> PRT
 15 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 16
 20 Val Ala Gln Pro Thr Ala Val Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr
 1 5 10 15
 25 Glu Gly His Pro Asp Lys Ile Cys Asp Ala Ile Ser Asp Thr Ile Leu
 20 25 30
 30 Asp Ala Leu Leu Glu Lys Asp Pro Gln Ser Arg Val Ala Val Glu Thr
 35 40 45
 35 Val Val Thr Thr Gly Ile Val His Val Val Gly Glu Val Arg Thr Ser
 50 55 60
 40 Ala Tyr Val Glu Ile Pro Gln Leu Val Arg Asn Lys Leu Ile Glu Ile
 65 70 75 80
 Gly Phe Asn Ser Ser Glu Val Gly Phe Asp Gly Arg Thr Cys Gly Val
 85 90 95
 45 Ser Val Ser Ile Gly Glu Gln Ser Gln Glu Ile Ala Asp Gly Val Asp
 100 105 110
 50 Asn Ser Asp Glu Ala Arg Thr Asn Gly Asp Val Glu Glu Asp Asp Arg
 115 120 125
 55 Ala Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asn Glu
 130 135 140
 Thr Glu Glu Tyr Met Pro Leu Pro Ile Ala Leu Ala His Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Arg Arg Leu Thr Gln Val Arg Lys Glu Gly Ile Val Pro His Leu Arg
 165 170 175
 5 Pro Asp Gly Lys Thr Gln Val Thr Phe Ala Tyr Asp Ala Gln Asp Arg
 180 185 190
 10 Pro Ser His Leu Asp Thr Val Val Ile Ser Thr Gln His Asp Pro Glu
 195 200 205
 15 Val Asp Arg Ala Trp Leu Glu Thr Gln Leu Arg Glu His Val Ile Asp
 210 215 220
 20 Trp Val Ile Lys Asp Ala Gly Ile Glu Asp Leu Ala Thr Gly Glu Ile
 225 230 235 240
 Thr Val Leu Ile Asn Pro Ser Gly Ser Phe Ile Leu Gly Gly Pro Met
 245 250 255
 25 Gly Asp Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly
 260 265 270
 30 Gly Met Ala Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser
 275 280 285
 35 Lys Val Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn
 290 295 300
 40 Ile Val Ala Ala Gly Leu Ala Asp Arg Ala Glu Val Gln Val Ala Tyr
 305 310 315 320
 Ala Ile Gly Arg Ala Lys Pro Val Gly Leu Tyr Val Glu Thr Phe Asp
 325 330 335
 45 Thr Asn Lys Glu Gly Leu Ser Asp Glu Gln Ile Gln Ala Ala Val Leu
 340 345 350
 50 Glu Val Phe Asp Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Glu Leu Asp Leu
 355 360 365
 55 Leu Arg Pro Ile Tyr Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg
 370 375 380
 Thr Asp Leu Asp Leu Pro Trp Glu Ala Ile Asp Arg Val Asp Glu Leu
 385 390 395 400

Arg Ala Ala Leu Lys Leu Ala
 405
 5
 <210> 17
 <211> 38
 10 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 15
 <400> 17
 gattcgacgg acgcaccgct ggcgtctcag tatccatc 38
 20
 <210> 18
 <211> 38
 25 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 30
 <400> 18
 gatggatact gagacgccag cggcgcgtcc gttegaatc 38
 35 <210> 19
 <211> 6631
 <212> DNA
 40 <213> Künstliche Sequenz
 45 <400> 19
 cgcgtcatat gcaggtagagg taacccccaaa agaggtaaaa cccgcgccac cgacttttca 60
 ggagcggggga cgcgggtttt tgccatgaat ccgaagatac tacatcagat ttttaggcca 120
 50 acttgagggc tgcgcgaagt tcatcaacgc ggtagatagc ctccaagga aggtccaaat 180
 cagtgcgacc aaagtggccg taggcagcag tgtagcgta gatcggacga agcagatcaa 240
 gctcacggat aattgctgct ggacgcaggt caaagacctc caacacggca gcctgaatct 300
 55 gctcgtcgct caggccttcc ttgttggtgt caaaggtttc aacgtaaagt ccgactggct 360
 ttgcgcgtcc aatggcgtat gcaacctgaa cttcagcgcg atcagcaagg cctgctgcca 420

	cgatgttctt	tgctacccaa	cgcatggcgt	atgcagcaga	gcggtccacc	ttgcttggat	480
	ccttaccgga	gaatgctcca	ccaccatggc	gagccatgcc	accgtaggta	tccacgatga	540
5	tcttgcgggc	ggtcagaccc	gcatcaccca	tggggccacc	cagaatgaag	gaacctgaag	600
	ggttgatcaa	cacggtgatc	tcaccggttg	ccagatcctc	aatgcctgcg	tctttgatta	660
10	cccaatcaat	gacgtgttcg	cgcagttggg	tttccaacca	tgcacgggtca	acttctgggt	720
	cgtgctgggt	ggagatgaca	acggtatcca	ggtggctagg	gcggtcttgc	gcatcgtatg	780
	cgaaggtagc	ctgggttttt	ccgtctggac	gcaggtgagg	aacgatgccc	tctttacgaa	840
15	cctgggtcag	acgacgtgac	agtcggtgcg	ccaacgcgat	aggaagaggc	atgtactctt	900
	cggtttcggt	ggtggcgtag	ccgaacatca	ggccctggtc	gccagcacct	gcgcggtcgt	960
20	cttcttcaac	gtcgccgttg	gtgcgggctt	cgtcggagtt	atccacgccg	tcagcgattt	1020
	cctgggactg	ctcaccgatg	gatactgaga	cgccagcggg	gcgtccgctc	aatccaacct	1080
	cagaggagtt	gaatccgatt	tcgatgagct	tgttgcggtc	taattgaggg	atctctacgt	1140
25	aagcgctggt	acggacctcg	ccaacaacat	ggacgattcc	ggtggtgacc	acagtttcca	1200
	ctgcgacgcg	cgactgcgga	tctttttcga	gcagcgcgtc	caaatggta	tcggaaatag	1260
30	catcacatat	tttgtctgga	tgtccctcag	ttacagattc	actggtgaac	aaacggacgg	1320
	cggttggctg	agccacaaat	acccttcttt	cgaagaagtt	gagaataaat	agtcttaaat	1380
	acaaaaaacc	aatatagacc	aagctgtcta	aaactgcaat	gtcagtggtc	tagctggatt	1440
35	tttctagact	tcgcgatacg	ccagtgccgc	gtcccaaatt	tgcgcagcaa	cctcgatttt	1500
	gctgccgtgc	tccacatcga	ctaccccacc	gtgagcatcc	aaaatccagc	cctcattgtg	1560
40	cttttgccca	aacactttgc	ccatgcccac	ctcattacac	atgaggaggt	cgcagccctt	1620
	cttcccgga	tttaaactcg	tagcgggctg	ctaaaggaag	cggaacacgt	agaaagccag	1680
	tccgcagaaa	cggtgctgac	cccggatgaa	tgtcagctac	tgggctatct	ggacaagggg	1740
45	aaacgcaagc	gcaaagagaa	agcaggtagc	ttgcagtggg	cttacatggc	gatagctaga	1800
	ctgggcggtt	ttatggacag	caagcgaacc	ggaattgcca	gctggggcgc	cctctggtaa	1860
50	ggttgggaag	ccctgcaaag	taaactggat	ggctttcttg	ccgccaagga	tctgatggcg	1920
	caggggatca	agatctgatc	aagagacagg	atgaggatcg	tttcgcatga	ttgaacaaga	1980
	tggattgcac	gcaggttctc	cggccgcttg	ggtggagagg	ctattcggct	atgactgggc	2040
55	acaacagaca	atcggtctgt	ctgatgccgc	cgtgttccgg	ctgtcagcgc	aggggcgccc	2100
	ggttcttttt	gtcaagaccg	acctgtccgg	tgcctgaat	gaactgcagg	acgaggcagc	2160
	gcggctatcg	tggctggcca	cgacgggcgt	tccttgcgca	gctgtgctcg	acgttgtcac	2220

tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc 2280
5 tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 2340
gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg 2400
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 2460
10 cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt 2520
cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatgggtg gaaaatggcc gcttttcttg 2580
15 attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac 2640
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggtgac cgcttcctcg tgetttacgg 2700
tatcgccgct cccgatccgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg 2760
20 agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 2820
ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggttcg gaatcgtttt ccgggacgcc 2880
25 ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgtggagt tcttcgcca cgctagcggc 2940
gcgccggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcacgag 3000
gcgtctcttc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 3060
30 ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 3120
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 3180
ggcggttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3240
35 gaggtggcga aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3300
cgtgcgctct cctgttcga cctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 3360
40 gggaaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt 3420
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct gcgccttatac 3480
cggtaaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3540
45 cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg 3600
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc 3660
50 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 3720
cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga 3780
tcctttgatc tttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 3840
55 tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaagg ccggccgcgg 3900
ccgcgcaaag tcccgttcg tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc caaaaacttt 3960

	aacgaacgtt	cgttataatg	gtgtcatgac	cttcacgacg	aagtactaaa	attggccccga	4020
	atcatcagct	atggatctct	ctgatgtcgc	gctggagtcc	gacgcgctcg	atgctgccgt	4080
5	cgatttaaaa	acggtgatcg	gatttttccg	agctctcgat	acgacggacg	cgccagcatc	4140
	acgagactgg	gccagtgccg	cgagcgacct	agaaactctc	gtggcggatc	ttgaggagct	4200
10	ggctgacgag	ctgcgtgctc	ggccagcgcc	aggaggacgc	acagtagtgg	aggatgcaat	4260
	cagttgcgcc	tactgcgggtg	gcctgattcc	ttcccgccct	gacccgcgag	gacggcgcg	4320
	aaaatattgc	tcagatgcgt	gtcgtgccgc	agccagccgc	gagcgcgcca	acaaacgcca	4380
15	cgccgaggag	ctggaggcgg	ctaggtcgca	aatggcgctg	gaagtgcgtc	ccccgagcga	4440
	aattttggcc	atggctcgta	cagagctgga	agcggcagcg	agaattatcg	cgatcgtggc	4500
20	ggtgccccga	ggcatgacaa	acatcgtaaa	tgccgcggtt	cgtgtgccgt	ggccgcccag	4560
	gacgtgtcag	cgccgccacc	acctgcaccg	aatcggcagc	agcgtcgcgc	gtcgaaaaag	4620
	cgcacaggcg	gcaagaagcg	ataagctgca	cgaatacctg	aaaaatgttg	aacgccccgt	4680
25	gagcggtaac	tcacagggcg	tcggctaacc	cccagtccaa	acctgggaga	aagcgtcaa	4740
	aaatgactct	agcggattca	cgagacattg	acacaccggc	ctggaaattt	tccgctgac	4800
30	tgttcgacac	ccatcccag	ctcgcgtgc	gatcacgtgg	ctggacgagc	gaagaccgcc	4860
	gcgaattcct	cgctcacctg	ggcagagaaa	atttccaggg	cagcaagacc	cgcgacttcg	4920
	ccagcgcttg	gatcaaagac	ccggacacgg	agaaacacag	ccgaagtat	accgagttgg	4980
35	ttcaaaatcg	cttgcgccgt	gccagtatgt	tgctctgacg	cacgcgcagc	acgcagccgt	5040
	gcttgtcctg	gacattgatg	tgccgagcca	ccaggccggc	gggaaaatcg	agcacgtaaa	5100
40	ccccgaggtc	tacgcgattt	tggagcgctg	ggcacgcctg	gaaaaagcgc	cagcttggat	5160
	cggcgtgaat	ccactgagcg	ggaaatgcc	gctcatctgg	ctcattgatc	cggtgtatgc	5220
	cgcagcaggc	atgagcagcc	cgaatatgcg	cctgctggct	gcaacgaccg	aggaaatgac	5280
45	ccgcgttttc	ggcgtgacc	aggctttttc	acataggctg	agccgtggcc	actgcactct	5340
	ccgacgatcc	cagccgtacc	gctggcatgc	ccagcacaat	cgcgtggatc	gcctagctga	5400
50	tcttatggag	gttgctcgca	tgatctcagg	cacagaaaaa	cctaaaaaac	gctatgagca	5460
	ggagttttct	agcggacggg	cacgtatcga	agcggcaaga	aaagccactg	cggaagcaaa	5520
	agcacttgcc	acgcttgaag	caagcctgcc	gagcgcgct	gaagcgtctg	gagagctgat	5580
55	cgacggcgtc	cgtgtcctct	ggactgctcc	agggcgctgc	gcccgtgatg	agacggcttt	5640
	tcgccacgct	ttgactgtgg	gataccagtt	aaaagcggct	ggtgagcgcc	taaaagacac	5700
	caagggtcat	cgagcctacg	agcgtgccta	caccgtcgct	caggcggtcg	gaggaggccg	5760

5 tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg 5820
 ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc 5880
 gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggg aaaaaggccg cagaacgctg 5940
 gaaagaccca aacagtgagt acgcccagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 6000
 10 acgaçaagct aggaaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggg ttatgactgt 6060
 tgagggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 6120
 acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc 6180
 15 gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcgt aggcagaaaa cggttcccc gtaggggtctc 6240
 tctcttggcc tcctttctag gtcgggctga ttgtcttga agctctctag gggggctcac 6300
 20 accataggca gataacgttc cccaccggct cgcctcgtaa gcgcacaagg actgctccca 6360
 aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc 6420
 tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcc agcttcttcc accctaaatt cgagagattg 6480
 25 gattcttacc gtggaaattc ttgcaaaaa tcgtccctg atcgcccttg cgacgttggc 6540
 gtcggtgccg ctggttgccg ttggttgac cgacttgatc agcggccgct cgatttaaat 6600
 30 ctcgagagggc ctgacgtcgg gcccggtacc a 6631

<210> 20

35 <211> 5863

<212> DNA

40 <213> Künstliche Sequenz

45 <400> 20
 tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gcaggtgagg taaccccaaa 60
 agaggtaaaa cccgcgccac cgacttttca ggagcgggga cgcgggtttt tgccatgaat 120
 ccgaagatac tacatcagat ttttaggcca acttgagggc tgcgcgaagt tcatcaacgc 180
 50 ggtcgatagc ctcccaagga aggtccaaat cagtgcgacc aaagtggccg taggcagcag 240
 tgtcagcgta gatcggacga agcagatcaa gtcacggat aattgctgct ggacgcaggc 300
 caaagacctc caacacggca gcctgaatct gtcgtcgtc caggccttcc ttgttggtgt 360
 55 caaagggttc aacgtaaagt ccgactggct ttgcgcgtcc aatggcgat gcaacctgaa 420
 cttcagcgcg atcagcaagg cctgctgcc cgatgttctt tgctacccaa cgcattggcg 480

	atgcagcaga gcggtccacc ttgcttggat cettaccgga gaatgctcca ccaccatggc	540
	gagccatgcc accgtaggta tccacgatga tcttgcggcc ggtcagacct gcatcaccca	600
5	tggggccacc cagaatgaag gaacctgaag ggttgatcaa cacggtgatc tcaccgggtg	660
	ccagatcctc aatgcctgcg tctttgatta cccaatcaat gacgtgttcg cgcagttggg	720
10	tttccaacca tgcacggta acttctgggt cgtgctgggt ggagatgaca acggtatcca	780
	ggtggctagg gcggtcttgc gcatcgatg cgaaggtagac ctgggttttt ccgtctggac	840
	gcaggtgagg aacgatgccc tctttacgaa cctgggtcag acgacgtgac agtcgggtg	900
15	ccaacgcgat aggaagaggc atgtactctt cggtttcggt ggtggcgtag ccgaacatca	960
	ggccctggtc gccagcacct gcgcggctgt cttcttcaac gtcgccgttg gtgcgggctt	1020
20	cgtcggagtt atccacgccg tcagcgattt cctgggactg ctcaccgatg gatactgaga	1080
	cgcacgcggt gcgtccgtcg aatccaacct cagaggagtt gaatccgatt tcgatgagct	1140
	tgttgcggac taattgaggg atctctacgt aagcgctggt acggacctcg ccaacaacat	1200
25	ggacgattcc ggtggtgacc acagtttcca ctgcgacgcg cgactgcgga tctttttcga	1260
	gcagcgcgtc caaaatggta tcggaaatag catcacatat tttgtctgga tgccctcag	1320
30	ttacagattc actggtgaac aaacggacgg cggttggctg agccacaaat acccttcttt	1380
	cgaagaagtt gagaataaat agtcttaaata aaaaaaac aatataagacc aagctgtcta	1440
	aaactgcaat gtcagtggtc tagctggatt tttctagact tcgcgatacg ccagtgccgc	1500
35	gtcccaaatt tgcgcagcaa cctcgatttt gctgccgtgc tccacatcga ctacccacc	1560
	gtgagcatcc aaaatccagc cctcattgtg cttttgcccc aacactttgc ccatgccac	1620
40	ctcattacac atgaggaggt cgcagccctt cttcccggga tttaaatcgc tagcgggctg	1680
	ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa	1740
	tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc	1800
45	ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcgggt ttatggacag caagcgaacc	1860
	ggaattgcc a gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat	1920
50	ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agatctgatc aagagacagg	1980
	atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg	2040
	ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc	2100
55	cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg	2160
	tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt	2220
	tccttgcgca gctgtgctcg acgtgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg	2280

	cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat	2340
5	catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca	2400
	ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca	2460
	ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa	2520
10	ggcgcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa	2580
	tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc	2640
15	ggaccgctat caggacatag cggttggtac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga	2700
	atgggctgac cgcttctcgc tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc	2760
	cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac	2820
20	caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg	2880
	ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc	2940
25	atgctggagt tcttcgccca cgctagcggc gcgccggccg gcccggtgtg aaataccgca	3000
	cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttctcgc tcaactgactc	3060
	gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc	3120
30	gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa	3180
	ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga	3240
35	cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgacag gactataaag	3300
	ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct	3360
	taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc ggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg	3420
40	ctgtaggtat ctacgttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc	3480
	ccccgttcag cccgaccgct gcgccttacc cggttaactat cgtcttgagt ccaaccgggt	3540
45	aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta	3600
	tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac	3660
	agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag ttggtagctc	3720
50	ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat	3780
	tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc	3840
55	tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat tttggctcatg agattatcaa aaaggatctt	3900
	cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgccatcgg cattttcttt tgcgttttta	3960
	tttgtaact gttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct ttgacaacag atgttttctt	4020

gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat tgtttgtctg cgtagaatcc 4080
tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct ttcgcttgag gtacagcgaa 4140
5 gtgtgagtaa gtaaagggtta catcgtagg atcaagatcc atttttaaca caaggccagt 4200
tttgttcagc ggcttgatg ggccagttaa agaattagaa acataaccaa gcatgtaaat 4260
10 atcgtagac gtaatgccgt caatcgatcat ttttgatccg cgggagtcag tgaacaggta 4320
ccatttgccg ttcattttaa agacgttcgc gcgttcaatt tcatctgtta ctgtgttaga 4380
tgcaatcagc ggtttcatca cttttttcag tgtgtaatca tcgttttagct caatcatacc 4440
15 gagagcgccg tttgctaact cagccgtgcg ttttttatcg ctttgcagaa gtttttgact 4500
ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct ttgttaaata aagattcttc 4560
20 gccttggtag ccatcttcag ttccagtgtt tgcttcaaact actaagtatt tgtggccttt 4620
atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atggttgtcg cctgagctgt agttgccttc 4680
atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt ttttccgtca ccgtcaaaga ttgatttata 4740
25 atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct gatacgtaa cttgtgcagt 4800
tgtcagtgtt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca gtgtagaata aacggatttt 4860
30 tccgtcagat gtaaatgtgg ctgaacctga ccattcttgt gtttggtctt ttaggataga 4920
atcatttgca tcgaatttgt cgctgtcttt aaagacgcgg ccagcgtttt tccagctgtc 4980
aatagaagtt tcgccgactt tttgatagaa catgtaaact gatgtgcat ccgcattttt 5040
35 aggatctccg gctaatagcaa agacgatgtg gtagccgtga tagtttgcca cagtgccgtc 5100
agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct tttgcagaag agatattttt 5160
40 aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca tttttttgct gttcagggat 5220
ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat gtttccttat atggcttttg 5280
gttcgtttct ttcgcaaacg cttgagttgc gcctcctgcc agcagtgcgg tagtaaagggt 5340
45 taatactggt gcttgttttg caaacttttt gatgttcac gttcatgtct ctttttttat 5400
gtactgtggt agcggctcgc ttcttcacgc cctcctgttt gaagatggca agttagttac 5460
50 gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc caaagtatac actttgccct 5520
ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac ccgcgcgatt tacttttcga 5580
cctcattcta ttagactctc gtttggttg caactggctt attttctct tttgtttgat 5640
55 agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga actaaaaaat ctatctgttt 5700
cttttcattc tctgtatttt ttatagtttc tgttgcaggg gcataaagtt gcctttttaa 5760
tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa taatagtga cggcagggtat 5820

atgtgatggg ttaaaaagga tcggcgccg ctcgatttaa atc 5863

5 <210> 21
 <211> 1224
 <212> DNA
 10 <213> Künstliche Sequenz

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1224)
 20 <223>

25 <400> 21
 gtg gct cag cca acc gcc gtc cgt ttg ttc acc agt gaa tct gta act 48
 Val Ala Gln Pro Thr Ala Val Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr
 1 5 10 15

30 gag gga cat cca gac aaa ata tgt gat gct att tcc gat acc att ttg 96
 Glu Gly His Pro Asp Lys Ile Cys Asp Ala Ile Ser Asp Thr Ile Leu
 20 25 30

35 gac gcg ctg ctc gaa aaa gat ccg cag tcg cgc gtc gca gtg gaa act 144
 Asp Ala Leu Leu Glu Lys Asp Pro Gln Ser Arg Val Ala Val Glu Thr
 35 40 45

40 gtg gtc acc acc gga atc gtc cat gtt gtt ggc gag gtc cgt acc agc 192
 Val Val Thr Thr Gly Ile Val His Val Val Gly Glu Val Arg Thr Ser
 50 55 60

45 gct tac gta gag atc cct caa tta gtc cgc aac aag ctc atc gaa atc 240
 Ala Tyr Val Glu Ile Pro Gln Leu Val Arg Asn Lys Leu Ile Glu Ile
 65 70 75 80

gga ttc aac tcc tct gag gtt gga ttc gac gga cgc acc gct ggc gtc 288
 Gly Phe Asn Ser Ser Glu Val Gly Phe Asp Gly Arg Thr Ala Gly Val
 85 90 95

50 tca gta tcc atc ggt gag cag tcc cag gaa atc gct gac ggc gtg gat 336
 Ser Val Ser Ile Gly Glu Gln Ser Gln Glu Ile Ala Asp Gly Val Asp
 100 105 110

55 aac tcc gac gaa gcc cgc acc aac ggc gac gtt gaa gaa gac gac cgc 384
 Asn Ser Asp Glu Ala Arg Thr Asn Gly Asp Val Glu Glu Asp Asp Arg
 115 120 125

gca ggt gct ggc gac cag ggc ctg atg ttc ggc tac gcc acc aac gaa 432
 Ala Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asn Glu

	130	135	140	
5	acc gaa gag tac atg cct ctt cct atc gcg ttg gcg cac cga ctg tca Thr Glu Glu Tyr Met Pro Leu Pro Ile Ala Leu Ala His Arg Leu Ser 145 150 155 160	480		
10	cgt cgt ctg acc cag gtt cgt aaa gag ggc atc gtt cct cac ctg cgt Arg Arg Leu Thr Gln Val Arg Lys Glu Gly Ile Val Pro His Leu Arg 165 170 175	528		
15	cca gac gga aaa acc cag gtc acc ttc gca tac gat gcg caa gac cgc Pro Asp Gly Lys Thr Gln Val Thr Phe Ala Tyr Asp Ala Gln Asp Arg 180 185 190	576		
20	cct agc cac ctg gat acc gtt gtc atc tcc acc cag cac gac cca gaa Pro Ser His Leu Asp Thr Val Val Ile Ser Thr Gln His Asp Pro Glu 195 200 205	624		
25	gtt gac cgt gca tgg ttg gaa acc caa ctg cgc gaa cac gtc att gat Val Asp Arg Ala Trp Leu Glu Thr Gln Leu Arg Glu His Val Ile Asp 210 215 220	672		
30	tgg gta atc aaa gac gca ggc att gag gat ctg gca acc ggt gag atc Trp Val Ile Lys Asp Ala Gly Ile Glu Asp Leu Ala Thr Gly Glu Ile 225 230 235 240	720		
35	acc gtg ttg atc aac cct tca ggt tcc ttc att ctg ggt ggc ccc atg Thr Val Leu Ile Asn Pro Ser Gly Ser Phe Ile Leu Gly Gly Pro Met 245 250 255	768		
40	ggt gat gcg ggt ctg acc ggc cgc aag atc atc gtg gat acc tac ggt Gly Asp Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly 260 265 270	816		
45	ggc atg gct cgc cat ggt ggt gga gca ttc tcc ggt aag gat cca agc Gly Met Ala Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser 275 280 285	864		
50	aag gtg gac cgc tct gct gca tac gcc atg cgt tgg gta gca aag aac Lys Val Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn 290 295 300	912		
55	atc gtg gca gca ggc ctt gct gat cgc gct gaa gtt cag gtt gca tac Ile Val Ala Ala Gly Leu Ala Asp Arg Ala Glu Val Gln Val Ala Tyr 305 310 315 320	960		
60	gcc att gga cgc gca aag cca gtc gga ctt tac gtt gaa acc ttt gac Ala Ile Gly Arg Ala Lys Pro Val Gly Leu Tyr Val Glu Thr Phe Asp 325 330 335	1008		
65	acc aac aag gaa ggc ctg agc gac gag cag att cag gct gcc gtg ttg Thr Asn Lys Glu Gly Leu Ser Asp Glu Gln Ile Gln Ala Ala Val Leu 340 345 350	1056		
70	gag gtc ttt gac ctg cgt cca gca gca att atc cgt gag ctt gat ctg Glu Val Phe Asp Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Glu Leu Asp Leu 355 360 365	1104		
75	ctt cgt ccg atc tac gct gac act gct gcc tac ggc cac ttt ggt cgc	1152		

Leu Arg Pro Ile Tyr Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg
 370 375 380

5 act gat ttg gac ctt cct tgg gag gct atc gac cgc gtt gat gaa ctt 1200
 Thr Asp Leu Asp Leu Pro Trp Glu Ala Ile Asp Arg Val Asp Glu Leu
 385 390 395 400

10 cgc gca gcc ctc aag ttg gcc taa 1224
 Arg Ala Ala Leu Lys Leu Ala
 405

<210> 22

15 <211> 407

<212> PRT

20 <213> Künstliche Sequenz

<400> 22

25 Val Ala Gln Pro Thr Ala Val Arg Leu Phe Thr Ser Glu Ser Val Thr
 1 5 10 15

30 Glu Gly His Pro Asp Lys Ile Cys Asp Ala Ile Ser Asp Thr Ile Leu
 20 25 30

35 Asp Ala Leu Leu Glu Lys Asp Pro Gln Ser Arg Val Ala Val Glu Thr
 35 40 45

Val Val Thr Thr Gly Ile Val His Val Val Gly Glu Val Arg Thr Ser
 50 55 60

40 Ala Tyr Val Glu Ile Pro Gln Leu Val Arg Asn Lys Leu Ile Glu Ile
 65 70 75 80

45 Gly Phe Asn Ser Ser Glu Val Gly Phe Asp Gly Arg Thr Ala Gly Val
 85 90 95

50 Ser Val Ser Ile Gly Glu Gln Ser Gln Glu Ile Ala Asp Gly Val Asp
 100 105 110

55 Asn Ser Asp Glu Ala Arg Thr Asn Gly Asp Val Glu Glu Asp Asp Arg
 115 120 125

Ala Gly Ala Gly Asp Gln Gly Leu Met Phe Gly Tyr Ala Thr Asn Glu
 130 135 140

Thr Glu Glu Tyr Met Pro Leu Pro Ile Ala Leu Ala His Arg Leu Ser
 145 150 155 160
 5 Arg Arg Leu Thr Gln Val Arg Lys Glu Gly Ile Val Pro His Leu Arg
 165 170 175
 10 Pro Asp Gly Lys Thr Gln Val Thr Phe Ala Tyr Asp Ala Gln Asp Arg
 180 185 190
 15 Pro Ser His Leu Asp Thr Val Val Ile Ser Thr Gln His Asp Pro Glu
 195 200 205
 20 Val Asp Arg Ala Trp Leu Glu Thr Gln Leu Arg Glu His Val Ile Asp
 210 215 220
 Trp Val Ile Lys Asp Ala Gly Ile Glu Asp Leu Ala Thr Gly Glu Ile
 225 230 235 240
 25 Thr Val Leu Ile Asn Pro Ser Gly Ser Phe Ile Leu Gly Gly Pro Met
 245 250 255
 30 Gly Asp Ala Gly Leu Thr Gly Arg Lys Ile Ile Val Asp Thr Tyr Gly
 260 265 270
 35 Gly Met Ala Arg His Gly Gly Gly Ala Phe Ser Gly Lys Asp Pro Ser
 275 280 285
 40 Lys Val Asp Arg Ser Ala Ala Tyr Ala Met Arg Trp Val Ala Lys Asn
 290 295 300
 Ile Val Ala Ala Gly Leu Ala Asp Arg Ala Glu Val Gln Val Ala Tyr
 305 310 315 320
 45 Ala Ile Gly Arg Ala Lys Pro Val Gly Leu Tyr Val Glu Thr Phe Asp
 325 330 335
 50 Thr Asn Lys Glu Gly Leu Ser Asp Glu Gln Ile Gln Ala Ala Val Leu
 340 345 350
 55 Glu Val Phe Asp Leu Arg Pro Ala Ala Ile Ile Arg Glu Leu Asp Leu
 355 360 365
 Leu Arg Pro Ile Tyr Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Gly His Phe Gly Arg
 370 375 380

5 Thr Asp Leu Asp Leu Pro Trp Glu Ala Ile Asp Arg Val Asp Glu Leu
385 390 395 400

Arg Ala Ala Leu Lys Leu Ala
405

10 <210> 23
<211> 9

15 <212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

20 <220>
<221> MISC_FEATURE

25 <222> (2) .. (2)
<223> Xaa=Phe oder Tyr

30 <220>
<221> MISC_FEATURE

35 <222> (3) .. (3)
<223> Xaa=Asp oder Ser

40 <220>
<221> MISC_FEATURE

45 <222> (4) .. (4)
<223> Xaa=beliebige Aminosäure

50 <220>
<221> MISC_FEATURE

55 <222> (5) .. (5)
<223> Xaa=beliebige Aminosäure

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (7) .. (7)

10 <223> Xaa= von Cys verschiedene Aminosäure

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (6) .. (6)

20 <223> Xaa= Ser oder Thr

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<222> (8) .. (8)

30 <223> Xaa= Gly oder Ala

<400> 23

35 Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val
1 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.